



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103293316 B

(45)授权公告日 2016.09.28

(21)申请号 201310103253.7

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2004.02.23

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103293316 A

(43)申请公布日 2013.09.11

(30)优先权数据

2003900777 2003.02.21 AU

2003901126 2003.03.06 AU

(62)分案原申请数据

200480007259.3 2004.02.23

(73)专利权人 梅德维特科学股份有限公司

地址 澳大利亚南澳大利亚

(72)发明人 M·P·布朗

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李英

WO 99/53757 A1,1999.10.28,

By Livia A. Casciola-Rosen et al.Autoantigens Targeted in Systemic Lupus Erythematosus Are Clustered in Two Populations of Surface Structures on Apoptotic Keratinocytes.《J. Exp. Med》.1994,第179卷

Carole McArthur et al.Intracellular trafficking and surface expression of SS-A (Ro), SS-B(La), poly(ADP-ribose) polymerase and a-fodrin autoantigens during apoptosis in human salivary gland cells induced by tumour necrosis factor- α .《Archives of Oral Biology》.2002,第47卷

(续)

审查员 舒霏霏

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书34页 附图14页

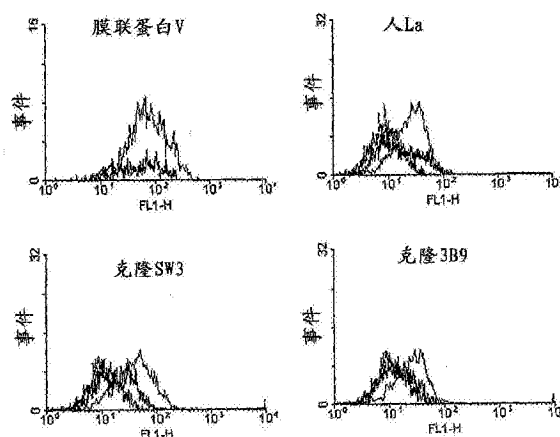
(54)发明名称

诊断和治疗的方法

(57)摘要

本发明为诊断和治疗的方法。本发明一般涉及对受试者或来自所述受试者的生物样品检测异常细胞,更特别是编程性细胞死亡细胞的方法,和用于这个目的的试剂。异常细胞或异常细胞组的存在提供了发生疾病或病症的特定疾病或病症或倾向的指征。更具体地,本发明涉及通过检测胞核外胞核分子、特别是La的存在,或者胞核外胞核分子水平的相对增加来检测编程性细胞死亡细胞的方法。本发明进一步提供通过筛选细胞或细胞组中胞核外胞核分子水平的增量调节而诊断或监测受试者或来自所述受试者的生物样品中以异常的、不期望的或者另外不适当

的细胞编程性细胞死亡为特征的症状的方法。本发明提供用于检测这些分子的诊断试剂。这样的诊断试剂包括免疫活性分子,例如抗体。



[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Hai B. Tran et al.Subcellular
Redistribution of La/SSB Autoantigen
During Physiologic Apoptosis in the Fetal
Mouse Heart and Conduction System.
《ARTHRITIS & RHEUMATISM》.2002,第46卷(第1

期),

Yasuko Kondo et al.Treatment of
prostate cancer in vitro and in vivo with
2-5A-anti-telomerase RNA component.
《Oncogene》.2000,第19卷

1. 针对La或其抗原性部分的相互作用分子在制备用于体外方法中检测样品中的晚期编程性死亡的肿瘤细胞定量、半定量或定性诊断试剂盒中的用途,所述的方法包括:

(i)将不经过体外透化步骤的样品中的细胞与针对La或其抗原性部分的相互作用分子相接触,和

(ii)检测相互作用分子-La复合体的形成,

其中检测到细胞中的相互作用分子-La复合体的非-胞核定位的形成指示了编程性死亡的肿瘤细胞。

2. 针对La或其抗原性部分的相互作用分子在制备用于体外方法中检测样品中的晚期编程性死亡肿瘤细胞的组合物中的用途,所述的体外方法包括:

(i)将不经过体外透化步骤的样品中的细胞与针对La或其抗原性部分的相互作用分子相接触,和

(ii)检测相互作用分子-La复合体的形成,

其中检测到细胞中的相互作用分子-La复合体的非-胞核定位的形成指示了编程性细胞死亡的肿瘤细胞。

3. 根据权利要求1或2的用途,其中所述相互作用分子是免疫相互作用分子。

4. 根据权利要求3的用途,其中所述免疫相互作用分子是抗体。

5. 根据权利要求4的用途,其中所述抗体是单克隆抗体。

6. 根据权利要求1或2的用途,其中所述肿瘤细胞是中枢神经系统瘤,视网膜母细胞瘤,成神经细胞瘤或其他儿科瘤,头颈癌,乳房或前列腺癌,肺癌,肾癌,食管胃癌,肝细胞癌,胰管胆汁瘤,结肠直肠癌,宫颈癌和肛门癌,子宫和其他生殖道癌,尿道癌,生殖细胞肿瘤,人免疫缺陷相关恶性肿瘤,淋巴瘤,白血病,恶性黑素瘤,肉瘤,内分泌瘤,间皮瘤和其他胸膜肿瘤,或神经内分泌肿瘤。

7. 根据权利要求6的用途,其中所述头颈癌是鳞状细胞癌,所述肺癌是小细胞肺癌或非小细胞肺癌,所述肾癌是肾细胞腺癌,所述胰管胆汁瘤是腺癌胰岛细胞瘤,所述生殖细胞肿瘤是睾丸癌或卵巢癌,所述卵巢癌是卵巢上皮癌,并且所述人免疫缺陷相关恶性肿瘤是Kaposi肉瘤,所述内分泌瘤是甲状腺瘤。

8. 针对La或其抗原性部分的相互作用分子在制备用于治疗受试者中的肿瘤病状的药物中的用途,其中,所述相互作用分子连接、键合或以其它方式缔合于下调肿瘤生长的试剂上,所述治疗不要求在施用所述相互作用分子之前透化所述肿瘤细胞。

9. 根据权利要求8的用途,其中所述相互作用分子是免疫相互作用分子。

10. 根据权利要求9的用途,其中所述免疫相互作用分子是抗体。

11. 根据权利要求10的用途,其中所述抗体是单克隆抗体。

12. 根据权利要求8的用途,其中所述试剂杀伤肿瘤细胞。

13. 根据权利要求8的用途,其中所述肿瘤病状是中枢神经系统瘤,视网膜母细胞瘤,成神经细胞瘤或其他儿科瘤,头颈癌,乳房和前列腺癌,肺癌,肾癌,食管胃癌,肝细胞癌,胰管胆汁瘤,结肠直肠癌,宫颈癌和肛门癌,子宫和其他生殖道癌,尿道癌,生殖细胞肿瘤,人免疫缺陷相关恶性肿瘤,淋巴瘤,白血病,恶性黑素瘤,肉瘤,内分泌瘤,间皮瘤和其他胸膜肿瘤,或神经内分泌肿瘤。

14. 根据权利要求13的用途,其中所述头颈癌是鳞状细胞癌,所述肺癌是小细胞肺癌或

非小细胞肺癌,所述肾癌是肾细胞腺癌,所述胰管胆汁瘤是腺癌胰岛细胞瘤,所述生殖细胞肿瘤是睾丸癌或卵巢癌,所述卵巢癌是卵巢上皮癌,所述人免疫缺陷相关恶性肿瘤是Kaposi肉瘤,并且所述内分泌瘤是甲状腺瘤。

15. 根据权利要求8的用途,其中所述肿瘤是转移癌。

16. 根据权利要求8的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

17. 根据权利要求16的用途,其中所述哺乳动物是人。

18. 根据权利要求8的用途,其中所述试剂选自:

—细胞因子

—趋化因子

—巨噬细胞、树突状细胞或T细胞激活剂;或者

—毒素。

19. 根据权利要求18的用途,其中所述巨噬细胞激活剂是N-甲酰基-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸或者细菌脂肽。

20. 根据权利要求19的用途,其中所述细菌脂肽是JBT2002。

21. 根据权利要求18的用途,其中所述毒素是放射性同位素。

22. 根据权利要求21的用途,其中所述放射性同位素是 α -粒子发射体, β -粒子发射体或 γ -粒子发射体。

23. 根据权利要求22的用途,其中所述 α -粒子发射体是Tb-149或Bi-213。

24. 根据权利要求18的用途,其中所述毒素是蓖麻毒素,前体药物或生物治疗剂。

25. 根据权利要求24的用途,其中所述前体药物是抗体-定向的前体药物转化酶。

26. 根据权利要求24的用途,其中所述生物治疗剂是催化性抗体。

诊断和治疗的方法

[0001] 本申请是申请号为200480007259.3、申请日为2004年2月23日的同名申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明一般涉及对受试者或来自所述受试者的生物样品检测异常细胞、更特别是编程性细胞死亡细胞的方法,和用于这个目的的试剂。异常细胞或异常细胞组的存在提供了发生疾病或病症的特定疾病或病症或倾向的指征。更具体地,本发明涉及通过检测胞核外胞核分子,特别是La的存在,或者胞核外胞核分子水平的相对增加来检测编程性细胞死亡细胞的方法。本发明进一步提供通过筛选细胞或细胞组中胞核外胞核分子水平的增量调节而诊断或监测受试者或来自所述受试者的生物样品中以异常的、不期望的或者另外不适当的细胞编程性细胞死亡为特征的症状的方法。本发明提供用于检测这些分子的诊断试剂。这样的诊断试剂包括免疫活性分子,例如抗体。

[0003] 本发明还涉及体外或体内治疗性定向的方法。本发明进一步提供与受试者分子上存在的表位特异性相互作用的抗体,特别是单克隆抗体。定向编程性细胞死亡细胞的能力是有用的,特别是在以编程性细胞死亡细胞存在为特征的诊断、免疫治疗和免疫预防处理的范围内。

[0004] 发明背景

[0005] 作者在该说明书中指的公开物书目详述按字母顺序收录在说明书最后。

[0006] 本说明书中对现有技术的参考不是并且不应该认为是澳大利亚公知常识现有技术形式部分的知识或任何形式的提示。

[0007] 以不受控制的方式生长的恶性肿瘤或癌症侵害正常组织,并且经常在远离原发组织的地方转移并生长。一般情况下,癌症从经历称作恶性转化的没有完全确知其过程的一个或只有几个正常细胞产生。癌症几乎能从身体内任何组织产生。从上皮细胞产生的称作癌的那些是最常见的癌症种类。肉瘤是从象成纤维细胞、肌肉细胞和脂肪细胞这样的细胞产生的间质组织的恶性肿瘤。淋巴样组织的实体恶性肿瘤称作淋巴组织瘤,淋巴细胞和其他造血细胞的骨髓和产生血液的恶性肿瘤称作白血病。

[0008] 在工业化国家,癌症是死亡的三大致因之一。由于传染病的治疗和心血管疾病的防治不断提高,并且估计寿命延长,癌症可能变成这些国家最常见的致命疾病。因此,需要成功地治疗癌症,去除或破坏所有的恶性细胞,而不使患者死亡。实现这个目的的一条理想途径是诱导抗肿瘤的免疫应答,区别对待肿瘤细胞和它们相应的正常细胞。然而,超过一个世纪的治疗癌症的免疫方法的尝试都是未能证实的。

[0009] 因此,目前治疗癌症的方法继续使用外科切除(如果可能的话),如果需要,接着进行放疗和/或化疗这一长期使用的方法。这种十分不成熟的治疗形式的成功率变动性十分大,并且通常因为肿瘤进一步发展和转移而使成功率大大降低。此外,这些治疗与严重的副作用有关,包括损形和手术形成的瘢痕(例如乳房切除术或截肢术),严重恶心和呕吐,化学疗法,并且最明显的,对正常组织的损伤,例如对发囊,内脏和骨髓,这是作为大多数癌症治

疗部分的有毒药物的相对非特异性定向机理结果引发的。

[0010] 此外,大多数抗癌治疗包括细胞毒性化疗药物、信号传导抑制剂、放疗、单克隆抗体和细胞毒性淋巴细胞通过编程性细胞死亡杀死癌症。虽然肿瘤可以包含一定比例的编程性细胞死亡细胞,甚至抗癌治疗之前发生一定面积的坏死,响应抗癌治疗,肿瘤中提前出现增加的编程性细胞死亡细胞数目和更大面积的坏死。然而,当细胞毒性化学治疗物质用于治疗晚期癌症时,经常难以评价细胞杀死的程度以及肿瘤对第一次治疗的响应。照惯例,在临床和放射评价肿瘤响应之前患者至少接受了三周期化疗。通常,少数晚期癌症患者对细胞毒性药物有反应,这样患者会经历没有获得益处的治疗副作用。因此,对于在预计有治疗反应的第一周期治疗之后能快速、方便和可靠地检测肿瘤杀伤(其经常接着预计存活率)的诊断方法有着没有满足的医疗需要。例如,对手术前接受化疗放疗的食管腺癌患者使用氟代-脱氧葡萄糖(FDG-PET)正电子发射X线体层照相术,以>90%灵敏性和特异性区别治疗响应者和不响应者,易于预测那些人随后经历其肿瘤的有效切除术。得知肿瘤是否早期响应会使大多数患者不用进行无效和可能有毒性的治疗。然后,对不响应患者进行第二周期治疗或所研究的药物的临床试验。

[0011] 因此,对于开发以定向方式诊断和治疗癌症的新的方法有着迫切和不断的需求。迄今为止,有效定向杀伤恶性细胞的想法还没有实现。

[0012] 在实施本发明的工作中,令人惊奇地测得,使用相互作用分子,例如免疫活性分子,事实上能可靠地和可检测地筛选胞核分子,并且进一步提供体外和体内以高度特异性方式精确而可靠地检测编程性细胞死亡细胞的方法。特别地,对肿瘤和转移的诊断和监测经常以一定比例编程性细胞死亡细胞的存在为特征,现在得以推进。进一步地,现在确定使用本发明的相互作用分子有利于在高度定向和特异性进行抗肿瘤治疗。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明的一方面涉及对受试者或来自所述受试者的生物样品检测编程性细胞死亡细胞的方法,所述方法包括用针对胞核分子或者其抗原部分的相互作用分子接触所述受试者或来自所述受试者生物样品的细胞或细胞提取物并且筛选相互作用分子-胞核分子复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是编程性细胞死亡细胞的指征。

[0015] 本发明的另一方面涉及对受试者或来自所述受试者的生物样品检测编程性细胞死亡细胞的方法,所述方法包括用针对胞核分子或者其抗原部分的免疫活性分子接触所述受试者或来自所述受试者生物样品的细胞或细胞提取物并且筛选免疫活性分子-胞核分子复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是编程性细胞死亡细胞的指征。

[0016] 本发明的另一方面提供对受试者或来自所述受试者的生物样品检测编程性细胞死亡肿瘤细胞的方法,所述方法包括用针对La或者其抗原部分的免疫活性分子接触所述受试者或来自所述受试者生物样品的细胞或细胞提取物并且筛选免疫活性分子-La复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是编程性细胞死亡肿瘤细胞的指征。

[0017] 本发明的另一方面提供对受试者或来自所述受试者的生物样品检测编程性细胞死亡肿瘤细胞的方法,所述方法包括用针对La或者其抗原部分的抗体接触所述受试者或来自所述受试者生物样品的细胞或细胞提取物并且筛选抗体-La复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是编程性细胞死亡肿瘤细胞的指征。

[0018] 本发明的另一方面涉及对受试者诊断或监测以异常的不期望的或者另外不适当

的细胞编程性细胞死亡为特征的症状的方法,所述方法包括用针对所述胞核分子或者其抗原决定簇或表位的胞核分子-结合有效量的相互作用分子接触所述受试者或来自所述受试者生物样品的细胞或细胞提取物,并且定性或定量测定胞核分子-免疫活性分子复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是细胞编程性细胞死亡的指征。

[0019] 本发明的另一方面涉及对受试者诊断或监测肿瘤病症的方法,所述方法包括用针对所述La或者其抗原决定簇或表位的La-结合有效量的免疫活性分子接触所述受试者或来自所述受试者生物样品的细胞或细胞提取物,并且定性或定量测定La-免疫活性分子复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是细胞编程性细胞死亡的指征,并且所述细胞编程性细胞死亡是所述肿瘤病症的指征。

[0020] 本发明进一步涉及检测生物样品中编程性细胞死亡细胞的分析方法,所述方法包括下面的步骤:-

[0021] (1)使针对胞核分子或者其抗原决定簇的相互作用分子与怀疑含有所述胞核分子的生物样品接触;和

[0022] (2)对步骤(1)中形成的复合体进行信号检测步骤,

[0023] 其中检测非胞核相互作用分子-胞核分子复合体形成是编程性细胞死亡细胞的指征。

[0024] 本发明的另一方面涉及对人检测编程性细胞死亡细胞的方法,所述方法包括向所述患者引入用报道分子标记的针对胞核分子或者其抗原决定簇的相互作用分子,使标记的相互作用分子通过循环系统或者向所述患者引入针对循环系统选择部分的相互作用分子传播,然后对所述患者进行报道分子检测手段检测以确定相互作用分子位置。

[0025] 本发明的另一方面提供对样品检测La或其片段、变体或衍生物的方法,包括使样品接触抗体或其片段或衍生物并且检测包括所述抗体和La或其片段、变体或衍生物的复合体的形成,其中La非胞核定位是编程性细胞死亡的指征。

[0026] 本发明进一步涉及针对胞核分子的相互作用分子用于制备检测来自患者的生物样品中编程性细胞死亡细胞的定量或半定量诊断试剂盒的用途,所述试剂盒可以带有使用说明并且可以是自动或半自动的或者是与自动机械或软件相匹配的形式。

[0027] 本发明的另一方面涉及对受试者治疗性和/或预防性治疗以细胞编程性细胞死亡为特征的病症的方法,所述方法包括在足以治疗所述病症的时间和条件下,对所述受试者施用有效量的针对胞核分子或其抗原部分的相互作用分子,所述相互作用分子与效应子结构连接、键合或缔合。

[0028] 本发明更特别提供对受试者治疗性和/或预防性治疗肿瘤病症的方法,所述方法包括在足以抑制、减小或另外减量调节肿瘤生长的时间和条件下,对所述受试者施用有效量的针对La或其抗原部分的免疫活性分子,所述免疫活性分子与效应子结构连接、键合或缔合。

[0029] 另一方面提供对患者治疗性治疗转移癌的方法,所述方法包括在足以抑制、减小或另外减量调节所述转移癌生长的时间和条件下,对所述受试者施用有效量的针对La或其抗原部分的免疫活性分子,所述免疫活性分子与效应子结构连接、键合或缔合。

[0030] 本发明的另一方面涉及与效应子结构偶联的抗-胞核分子相互作用分子用于制备治疗患者病症的药物的用途,所述病症以细胞编程性细胞死亡为特征,其中所述效应子结

构治疗所述病症。

[0031] 另一方面,本发明涉及含有上面定义的调节剂和一种或几种药学可接受载体和/或稀释剂的药物组合物。所述调节剂称作活性成分。

[0032] 本发明的另一方面涉及在本发明的方法中使用时的上面定义的药剂。

[0033] 附图简述

[0034] 图1是在将细胞从组织培养瓶中刮出用于流式细胞仪分析之前有或没有血清培养24小时的前列腺癌细胞系LNCaP的图解表示。细胞用碘化丙锭(PI)染色,并且(A)膜联蛋白V-FITC,(B)正常人血清(NHS)或亲和纯化的人La自身抗体(hLa)和小鼠抗-人IgG-FITC,(C)鼠同种型对照物或鼠抗-hLa mAb克隆SW3和抗-小鼠IgG-FITC,(D)鼠同种型对照物或鼠抗-hLa mAb克隆3B9和抗-小鼠IgG-FITC。直方图显示分选(gated)作为PI中间体的细胞(即晚编程性细胞死亡细胞)。蓝色线,NHS或鼠同种型对照物;黑色线,对血清中生长的LNCaP细胞染色的膜联蛋白V或抗-La;红色线,对没有血清生长的LNCaP细胞染色的膜联蛋白V或抗-La。

[0035] 图2是抗-La功能的图解表示。一旦抗-La抗体诊断化疗诱导的癌细胞的编程性细胞死亡(图2A),它们可以接着递送癌治疗的其他药征,其与死亡细胞附近保留的那些存活癌细胞有作用的非交叉抗性机理(图2B)。图2A所示的是第一次化疗之后,抗-La抗体(黄色)检测编程性细胞死亡癌细胞(暗灰色),其接近存活癌细胞生长(浅灰色)。图2B所示的是抗-La抗体(紫色),它带有非交叉抗性抗癌治疗,递送对于保留活癌细胞的杀伤(bystander killing)(红色)。

[0036] 图3是描述编程性细胞死亡体体外逐渐形成并且结合抗-La抗体的图解表示。使用0.5 μ M星形孢菌素(STS)对Jurkat人T细胞白血病细胞系诱导编程性细胞死亡。用FITC标记的3B9和胞核非渗透性(impermeant)核酸结合染料碘化丙锭(PI)对细胞染色。箭头表示编程性细胞死亡体随着时间逐渐形成。象限游标设置为用同种型对照物Sa15<3%染色。

[0037] 图4是描述与编程性细胞死亡Jurkat细胞结合的抗-La抗体与渐增膜渗透性相关的图解表示。使用0.5 μ M STS对Jurkat细胞诱导编程性细胞死亡。用FITC-标记的Sa15(同种型对照物)或FITC-标记的3B9(抗-La抗体)或FITC-标记的抗- β -微管蛋白mAb(微管蛋白)和PI对细胞染色。

[0038] 图5是与编程性细胞死亡Jurkat细胞结合的抗-La抗体的时间过程的图解表示。使用0.5 μ M STS对Jurkat细胞诱导编程性细胞死亡。用FITC-标记的Sa15(同种型对照物)或FITC-标记的3B9(抗-La抗体)或FITC-标记的抗- β -微管蛋白mAb(微管蛋白)台盼蓝对细胞染色。纵轴所示的是对用每一种指示剂染色呈阳性的各个时间点总的细胞百分比。数据以单线作图(A)或者用Prism v3.0使用最小方差方法作成曲线(B)。

[0039] 图6是描述编程性细胞死亡体和与编程性细胞死亡体结合的抗-La抗体体外是稳定的之图解表示。使用0.5 μ M STS对Jurkat细胞诱导编程性细胞死亡。用FITC-标记的3B9和碘化丙锭(PI)(上排)对细胞染色。分别使用前向散点图(FSC)和侧面散点图(SSC)(下排)证实编程性细胞死亡体的大小和内部复杂性。

[0040] 图7是描述膜联蛋白V,7AAD和抗-La抗体与编程性细胞死亡细胞结合在体外编程性细胞死亡过程中与时间相关并且随着时间改变的图解表示。使用0.5 μ M STS对Jurkat细胞诱导编程性细胞死亡。用FITC-标记的人膜联蛋白V(annV-FITC),R-藻红蛋白-标记的3B9

(PE-3B9)和7AAD对细胞染色。

[0041] 图8是描述体外编程性细胞死亡期间膜联蛋白V, 7AAD和抗-La抗体与编程性细胞死亡细胞的时间依赖性结合是相关的之图解表示。使用0.5 μ M STS对Jurkat细胞诱导编程性细胞死亡。用FITC-标记的人膜联蛋白V(annV-FITC), R-藻红蛋白-标记的3B9(3B9)和7AAD对细胞染色。对R1-3区中的事件(event)(左手一组)分析大小(前向散点图或FSC)和内部复杂性(侧面散点图或SSC)(中间一组)并且用7AAD和3B9染色(右手一组)。

[0042] 图9包括描述抗-La抗体与坏死Jurkat细胞结合的图像和图解表示。通过在56 $^{\circ}$ C下加热1小时对Jurkat细胞诱导坏死。A. 用Alexa488-标记的3B9(抗-La抗体)(绿色)和胞核非渗透性DNA-结合染料, 7-氨基-放线菌素D(7AAD)(红色)对细胞染色, 或B. 用Alexa488-标记的3B9(抗-La抗体)(绿色)和R-藻红蛋白-标记的膜联蛋白V(红色)对细胞染色, 并且通过激光扫描同焦点显微镜显像。C. 用FITC-标记的Sa15(同种型对照物)或FITC-标记的3B9(抗-La抗体)和PI对细胞染色并且通过流式细胞仪进行分析。

[0043] 图10是描述抗-La抗体优先与晚编程性细胞死亡细胞和编程性细胞死亡体结合的图解表示。使用0.5 μ M STS对Jurkat细胞诱导编程性细胞死亡。用FITC-标记的3B9和PI对细胞染色。编程性细胞死亡诱导后20小时或48小时, 对用PI差别染色(左手栏中的1和2)的3B9⁺亚群进行分选用于散点特征分析。散点分析(右手分析)表明随时间积累的3B9⁺PI^{中间体}作用较小(根据前向散点图[FSC]测定的较低大小)并且颗粒较小(根据前向散点图[SSC]测定的减小的内部复杂性)(下面右手组)。象限游标设置在同种型对照物Sa15染色<3%。

[0044] 图11是描述抗-La抗体结合是半胱天冬酶(caspase)3依赖性的并且与编程性细胞死亡体形成相关的图解表示。用表达增强的单独的绿色荧光蛋白质(EGFP)或原半胱天冬酶3和EGFP的质粒DNA载体瞬时转染MCF-7细胞。使用0.5 μ M STS对瞬时转染的MCF-7细胞诱导编程性细胞死亡, 并且用FITC-标记的3B9和7AAD对细胞染色。散点图中显示的细胞(左手图)在绿色荧光上分选处理。接着, 各个散点图中象限1和2中的事件(左手图)被分选处理用于散射特征分析。散射分析(右手组)表明3B9结合是半胱天冬酶3依赖性的, 因此与编程性细胞死亡体形成有关, 因为编程性细胞死亡体较小(根据前向散点图[FSC]测定的较低大小)和较小颗粒(根据前向散点图[SSC]测定的降低的内部复杂性)(下面右手组)。象限游标设置在同种型对照物Sa15染色<3%。

[0045] 图12包括描述抗-La抗体结合是半胱天冬酶3依赖性的并且与编程性细胞死亡体形成相关的成像和图解表示。用载体对照物(B)或表达原半胱天冬酶3(C和C')的载体稳定转染MCF-7细胞。用1 μ M STS处理24小时对MCF-7转染子执行编程性细胞死亡。A. 对于流式细胞仪分析, 用Alexa488-标记的3B9和碘化丙啶(PI)对细胞染色。B, C和C'。对于荧光显微镜分析, 用Alexa488-标记的3B9(绿色)和胞核染料DAPI(蓝色)对细胞染色。指明编程性细胞死亡体(箭头)。

[0046] 图13是抗-La抗体死亡细胞胞质载量的图像。用0.5 μ M STS处理24小时对Jurkat细胞诱导编程性细胞死亡。用胞核非永久性染料TOPRO3(蓝色), Alexa488-标记的3B9或抗-La抗体, 同种型对照物Sa15或抗-PARP mAb(绿色)和R-藻红蛋白(PE)-标记的人膜联蛋白V(红色)对细胞染色并且使用同焦点激光扫描显微镜观察。A. Alexa488-标记的3B9染色观察到下面的A'。较高放大率; 对于使用Sa15的抗-La抗体染色观察到阴性同种型对照; C. 抗-PARP染色。

[0047] 图14是描述抗其他胞核和核糖胞核抗原的其他单克隆抗体也结合编程性细胞死亡体的图像。用0.5 μ M STS处理24小时对Jurkat细胞诱导编程性细胞死亡。用Alexa488-标记的抗- α -胞衬蛋白mAb(绿色)和7AAD(红色)对细胞染色并且通过激光扫描同焦点显微镜观察。

[0048] 图15是描述与编程性细胞死亡初期T细胞相比较,恶性Jurkat T细胞编程性细胞死亡之后,La/SS-B表达增量调节的图解表示。聚蔗糖-纯化的外周血单核细胞(PBMC)在有10%胎牛血清的RPMI-1640中培养4天,然后在培养的最后24小时用1 μ M STS处理。类似地,在培养的最后24小时用1 μ M STS诱导编程性细胞死亡之前用T细胞促细胞分裂剂concanavalin A(PBMC-ConA)10微克/毫升m将PBMC活化4天。用0.5 μ M STS处理24小时对Jurkat细胞(Jurkat)诱导编程性细胞死亡。象限游标设置在同种型对照物Sa15染色<3%。

[0049] 图16是描述抗其他胞核和核糖胞核抗原的其他单克隆抗体也结合编程性细胞死亡细胞的图解表示。用0.5 μ M STS对Jurkat细胞诱导编程性细胞死亡。用PI和各种FITC-标记的mAb对细胞染色:同种型对照物, Sa15, 对于抗-La/SS-B克隆3B9(抗-La抗体), 抗- β -微管蛋白克隆TUB2.1FITC偶联物(Sigma F2043), 增殖细胞胞核抗原(PCNA)克隆PC10(Oncogene Cat #NA03), 小鼠抗- α -胞衬蛋白(非红色抗-血影蛋白)Chemicon MAB1622, 抗-lamen B克隆101-B7(致癌基因cat #NA12)和抗-PARP克隆C2-10(致癌基因cat #AM30)。象限游标设置在相应同种型对照物抗体染色<3%。

[0050] 图17是描述抗其他胞核和核糖胞核抗原的其他单克隆抗体也结合编程性细胞死亡体的图解表示。用单独表达EGFP或-原半胱天冬酶3和EGFP的质粒DNA载体瞬时转染EGFP MCF-7细胞。用0.5 μ M STS对瞬时转染的MCF-7细胞诱导编程性细胞死亡, 并且用7AAD和FITC-标记的同种型mAb, Sa15, 和抗La/SS-B mAb(3B9), 核纤层蛋白B和增殖细胞胞核抗原(PCNA)对细胞染色。上面一组表示没有转染的MCF-7细胞(分选为EGFP-阳性)。没有转染的MCF-7细胞的外观与用单独表达EGFP的DNA载体转染的MCF-7细胞(没有给出数据)几乎相同。

[0051] 图18是描述通过人抗-La自身抗体检测编程性细胞死亡人细胞的图解表示。通过用0.5 μ M STS使Jurkat细胞发生编程性细胞死亡的细胞用经La-亲和纯化的人抗-La自身抗体(上面一组)或抗人La的鼠mAb3B9(下面一组)染色。PI⁺细胞分选并且数据以编程性细胞死亡诱导之后各个时间点的直方图表示。阴性对照, 人IgG(粗线); 人抗-hLa抗体和3B9(细线)。

[0052] 图19是描述另一种抗-人La/SS-B单克隆抗体也检测编程性细胞死亡人细胞的图解表示。对于Jurkat细胞, 或者在体外培养中没有处理(未处理)或者用0.5 μ M STS处理17小时诱导编程性细胞死亡(处理)。细胞用PI和FITC-标记的抗-鼠二抗或mAb克隆SW3或mAb克隆3B9染色。

[0053] 图20是描述抗-La抗体与来自啮齿类物种的初期编程性细胞死亡细胞结合的图解表示。没有补充(A,D), 或者加入1 μ M地塞米松(B,E)或0.5 μ M STS(C,F)下, 体外将鼠(A-C)或大鼠(D-F)胸腺细胞培养21-24小时。细胞用FITC-标记的同种型mAb, Sa15(对照)或FITC-标记的3B9(抗-La抗体)和碘化丙锭(PI)染色。

[0054] 图21是描述抗-La抗体与来自啮齿类物种的编程性细胞死亡肿瘤细胞结合的图解表示。鼠胸腺成淋巴细胞细胞系, EL-4(A-E)和大鼠前列腺癌细胞系, AT-3.1(F)与0.5 μ M

STS(A,F),依托泊苷(B)或依托泊苷和环磷酰胺(C),体外培养(A-C,F)24小时,或者从没有处理的(D)或者体内用环磷酰胺和依托泊苷处理48小时诱导肿瘤编程性细胞死亡(E)的同源C57BL/6小鼠的皮下植入物回收EL-4肿瘤细胞。细胞用FITC-标记的同种型mAb, Sa15(对照)或者FITC-标记的3B9(抗-La抗体)和碘化丙锭(PI)染色。

[0055] 图22是描述抗-La抗体与多种编程性细胞死亡人和猴子肿瘤细胞系结合的图解表示。细胞系用0.5-1 μ M STS处理24小时,诱导编程性细胞死亡:A. Jurkat T细胞白血病; B. U2OS骨肉瘤细胞; C. HeLa子宫颈癌细胞; D. MG63骨肉瘤细胞; E. COS-7猴子肾成纤维细胞。细胞用FITC-标记的同种型mAb, Sa1(对照)或者FITC-标记的3B9(抗-La抗体)和碘化丙锭(PI)染色。

[0056] 图23是通过各种体外阶段的编程性细胞死亡进程的图示描述。编程性细胞死亡刺激之后,编程性细胞死亡细胞收缩并且片段化成膜结合部分,已知是编程性细胞死亡体,其随着时间逐渐泄漏或再次坏死。最后,编程性细胞死亡体分解成寡核小体,进而分解为自由DNA。

[0057] 图24是按惯例通过用膜联蛋白V和胞核永久性染料例如7AAD染色定义的编程性细胞死亡阶段的图示描述。用0.5 μ M星形孢菌素处理16小时,对Jurkat细胞诱导编程性细胞死亡,并且用膜联蛋白V(AV)和7-氨基-放线菌素D(7AAD)染色。1,活细胞(AV⁻, 7AAD⁻); 2,早期编程性细胞死亡细胞(AV⁺, 7AAD⁻); 3,晚期编程性细胞死亡细胞(AV⁺, 7AAD⁺)。

[0058] 本发明的详细描述

[0059] 本发明是部分根据下面令人惊奇的发现提出的:使用免疫活性分子对胞核外胞核分子表达进行筛选,提供体外或体内检测编程性细胞死亡细胞的存在的高度特异性和可靠的方法。这个发现特别重要,因为以前朝着筛选与编程性细胞死亡细胞相关的抗原的试验工作(从而鉴定抗原)都没有鉴定胞核分子,特别是La,为候选抗原。确实,其他不相关的抗原,例如磷脂酰基丝氨酸已经被反复鉴定了。令人遗憾的是,这些不相关的分子表现出显著缺陷,特别是由于非编程性细胞死亡事件,例如细胞机械或其他破碎,能发生瞬时胞外表达。还有,以前以认为细胞染色是一些编程性细胞死亡细胞对抗体-抗原的细胞表面复合体的内在化活性进程的结果为基础分析的胞核分子、例如La已经被排除作为编程性细胞死亡本身的标记。也就是,排除了膜渗透性作为抗体进入细胞的一个途径。因此,还没有开发出鉴定编程性细胞死亡细胞本身的方法。然而,现在开发出使用抗-胞核免疫活性分子、特别是抗-La/SS-B免疫活性分子体外和体内检测晚期编程性细胞死亡细胞和编程性细胞死亡体的方法。所述方法涉及但不要求附加步骤,如证明结合的渗透作用,这在本发明出现之前是需要的。以前已知抗-胞核抗体结合与编程性细胞死亡诱导没有关系,它取决于细胞的渗透作用,结合是表面膜相关的并且取决于结合机理而不是被动进入并且与编程性细胞死亡体中包含的抗原特异性结合。

[0060] 胞核分子例如La令人惊奇地鉴定为编程性细胞死亡细胞的高特异性、可检测和排它标记,现在允许开发涉及诊断和监测编程性细胞死亡细胞群、特别是肿瘤和它们的转移的一系列的试剂和方法。此外,确定使用针对这些胞核分子的免疫活性分子提供针对以编程性细胞死亡细胞的存在为特征的病症的定向治疗性和/或预防性治疗的高特异性方法。特别是,肿瘤治疗特定内容的重要性在于发现使抗-La免疫活性分子定向于例如肿瘤中的编程性细胞死亡细胞能成功地用来提供例如通过递送有毒分子而实现旁观(bystander)非

编程性细胞死亡肿瘤细胞杀伤的方法。

[0061] 因此,本发明的一个方面涉及对受试者或来自所述受试者的生物样品检测编程性细胞死亡细胞的方法,所述方法包括用针对胞核分子或者其抗原部分的相互作用分子接触所述受试者或所述生物样品的细胞或细胞提取物并且筛选相互作用分子-胞核分子复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是编程性细胞死亡细胞的指征。

[0062] 更具体地,本发明涉及对受试者或来自所述受试者的生物样品检测编程性细胞死亡细胞的方法,所述方法包括用针对胞核分子或者其抗原部分的免疫活性分子接触所述受试者或所述生物样品的细胞或细胞提取物并且筛选免疫活性分子-胞核分子复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是编程性细胞死亡细胞的指征。

[0063] 涉及的“胞核分子”应该理解是指编程性细胞死亡之前永久性或瞬时存在于变成编程性细胞死亡主体的细胞的胞核中的任何蛋白质或非蛋白质分子。优选地,所述胞核分子是Ro52,Ro60,La/SS-B,凝溶胶蛋白, α -胞衬蛋白,核仁纤维蛋白,U1小核核糖核蛋白质(U1snRNP),异核核糖核蛋白质(hnRNP),核纤层蛋白B,聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP),增殖细胞核抗原(PCNA),SC-35剪接因子,Smith(Sm)抗原。更优选地,所述胞核分子是La。

[0064] 不在任何方面限制本发明,抗-La抗体特异性检测编程性细胞死亡。先前理解的La的非胞核定位及其随后的在编程性细胞死亡细胞外部表面检测是根据编程性细胞死亡特异性结果半胱天冬酶(caspase)激活提出的。然而,虽然在晚期编程性细胞死亡细胞中检测不到半胱天冬酶活性(P.Smolewski等,J Immunol Methods 2002),但是已经确定胞核分子例如La仍然能被检测出来。通过其他诊断方法不容易检测晚期编程性细胞死亡细胞。

[0065] 关于“非胞核定位”应该理解是指位于细胞任何区或者其部分而不是在完整细胞核之内的受试者胞核分子。优选地,受试者非胞核定位如此,使得La暴露于胞外环境,这里称作“胞外定位”,发生时,例如,在那里胞核分子易位到编程性细胞死亡细胞的胞质中,所述细胞膜变成可渗透性或者在那里在编程性细胞死亡体中表达该分子,其中编程性细胞死亡体在编程性细胞死亡细胞中形成并且最后在编程性细胞死亡细胞完全分解时分散到胞外环境中。

[0066] 关于“编程性细胞死亡”细胞应该理解是指正在经历或者已经经历编程性细胞死亡的细胞。本发明不受任何一种理论或作用方式限制,编程性细胞死亡是需要垂死细胞代谢活性的激活过程。经常地,编程性细胞死亡的特征在于细胞的收缩,DNA裂解成片段(在凝胶上给出“阶梯模式”)并且在于染色质的缩合和着边。很多情况下发生细胞编程性细胞死亡。因此,La的非胞核定位的鉴定、例如和表达该分子的细胞的性质和位置一起提供了监测和/或诊断很多种病症的方法,包括心肌梗塞(心脏病发作)或脑(中风),或者自身免疫和其他炎症疾病,或者病毒疾病,例如AIDS,或神经退化疾病,例如早老性痴呆或帕金森病,或者急性实体器官或骨髓移植排异,或者化疗或放疗引起的组织损伤(‘粘膜炎’)或肿瘤。在一个优选实施方案中,受试者编程性细胞死亡细胞是编程性细胞死亡肿瘤细胞。

[0067] 根据这个优选的实施方案,提供对受试者或来自所述受试者的生物样品检测编程性细胞死亡肿瘤细胞的方法,所述方法包括用指向La或者其抗原部分的免疫活性分子接触所述受试者或所述生物样品的细胞或细胞提取物并且筛选免疫活性分子-La复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是编程性细胞死亡肿瘤细胞的指征。

[0068] 优选地,所述非胞核定位发生在编程性细胞死亡细胞的胞质内或编程性细胞死亡

细胞形成的编程性细胞死亡体之内。

[0069] 关于“瘤细胞”应该理解是指表现异常死亡的细胞。术语“生长”应该以其广义理解并且包括指增殖。以这个观点,异常细胞生长的例子是细胞的不受控制的增殖。瘤细胞可以是良性细胞或恶性细胞。受试者瘤细胞可以是任何细胞类型,例如上皮细胞或非上皮细胞。

[0070] 术语“瘤形成”常见的医疗意义指“新细胞生长”,其作为对正常生长控制、例如对肿瘤细胞生长响应能力的丧失的结果。

[0071] “增殖”指经历异常高生长速度的细胞。然而,根据这里使用的,术语“瘤形成”和“增生”能互换使用,一般指经历异常细胞生长速度的细胞。瘤形成和增生包括“肿块”,其可以是良性的,恶性之前的或恶性的。术语“瘤”应该理解是身体上的损伤、肿瘤或者其他包围的或没有包围的物质块或者其他生长形式,包括肿瘤细胞。

[0072] 根据这里使用的,术语“超增殖的”和“瘤形成”互换使用并且指异常状态或者以快速增殖或新生物为特征的病症中的那些细胞。术语意思是包括所有类型的癌生长或致癌基因突变、转移组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而不考虑病理组织学类型或侵入状态。”病理性超增殖的”细胞在以恶性肿瘤生长为特征的疾病状态中存在。

[0073] 本领域技术人员公认术语“癌”并且指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤,包括呼吸系统癌,肠胃系统癌,泌尿生殖系统癌,睾丸癌,乳腺癌,前列腺癌,内分泌系统癌和黑素瘤。例举的癌包括从乳房组织形成的那些。该术语还包括癌肉瘤,例如包括癌和肉瘤组织构成的恶性肿瘤。”腺癌”指腺组织产生的癌或者其中肿瘤细胞生成可识别的腺结构。

[0074] 这里使用的术语“瘤”包括前面三段中讨论的所有术语。

[0075] 本发明的瘤和瘤形成细胞的例子包括但不限于中枢神经系统瘤,视网膜母细胞瘤,成神经细胞瘤和其他儿科瘤,头颈癌(例如鳞状细胞癌),乳房和前列腺癌,肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌),肾癌(例如肾细胞腺癌),食管胃癌,肝细胞癌,胰管胆汁瘤形成(例如腺癌胰腺内分泌瘤),结肠直肠癌,宫颈癌和肛门癌,子宫和其他生殖道癌,尿道癌(例如输尿管和膀胱癌),胚细胞肿瘤(例如睾丸胚细胞肿瘤或卵巢胚细胞肿瘤),卵巢癌(例如卵巢上皮癌),未知的原发癌,人免疫缺陷相关恶性肿瘤(例如Kaposi's肉瘤),淋巴瘤,白血病,恶性黑素瘤,肉瘤,内分泌瘤(例如甲状腺瘤),间皮瘤和其他胸膜肿瘤,神经内分泌肿瘤和癌样肿瘤。

[0076] 这里关于“La”包括指La的所有形式,或者其同系物、或同源物或衍生物。关于“La”应该理解是包括指从La的La mRNA或变体或多形变体交替剪接产生的任何同种型。还应该理解“La”是替代的术语SS-B的分子。

[0077] “相互作用分子”是对La或者其抗原部分或者其同系物或衍生物具有特异性(不必须是排它特异性,但是排它特异性是优选的)和结合亲和性的任何分子。相互作用分子的例子包括免疫性活性分子和肽模拟物质。虽然优选的免疫活性分子是一种免疫球蛋白分子,本发明延伸到其他免疫活性分子,例如抗体片段,单链抗体,去免疫抗体包括人源化抗体和T-细胞相关抗原-结合分子(TABMs)。最优选地,免疫活性分子是一种抗体,例如多克隆抗体或单克隆抗体。应该理解主体免疫活性分子可以与任何其他蛋白质或非蛋白质分子或细胞连接、键合或另外缔合。最优选地,抗体是单克隆抗体。

[0078] 相互作用分子是“针对”胞核分子,例如La,或者,到相互作用分子是免疫活性分子的程度。应该理解分子不必须是排它特异性的,但是排它特异性是优选的。例如,已知抗体

有时和其他抗原交叉反应。抗原决定簇或表位包括能产生免疫反应的分子的部分。抗原决定簇或表位可以是B-细胞表位或者适合T-细胞受体结合分子的部分。术语“抗原部分”包括抗原决定簇或表位。

[0079] 优选地,主体免疫活性分子是抗体。

[0080] 更优选地,所述抗体是单克隆抗体。

[0081] 根据这个优选的实施方案,提供对受试者或来自所述受试者的生物样品检测编程性细胞死亡肿瘤细胞的方法,所述方法包括用针对La或者其抗原部分的抗体接触所述受试者或所述生物样品的细胞或细胞提取物并且筛选抗体-La复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是编程性细胞死亡细胞的指征。

[0082] 优选地,所述非胞核定位发生在编程性细胞死亡细胞的胞质中或者编程性细胞死亡细胞形成的编程性细胞死亡体中。

[0083] 关于“生物样品”应该理解是指来自个体的任何生物材料样品,例如但不限于,粘液、粪便、尿液、血液、血清、细胞提取物、活组织检查标本和导入个体身体并且随后除去的液体,例如肺灌洗之后从肺提取的盐溶液或者从灌肠法洗液回收的溶液。根据本发明的方法分析的生物样品可以直接被分析或者在分析之前可能需要某些形式的处理。例如,活组织检查样品在分子之前需要匀浆化或切片。

[0084] 根据本发明,建议编程性细胞死亡细胞、包括编程性细胞死亡恶性或非恶性瘤细胞胞外表达La。因此,胞外La定性或定量水平检测提供细胞是编程性细胞死亡和与以细胞编程性细胞死亡为特征的病症相关的指征。

[0085] 因此本发明提供一种诊断或监测以异常的不期望的或者另外不适当的细胞编程性细胞死亡为特征的病症的方法。所谓“异常的不期望的或者另外不适当的”意思是受试者编程性细胞死亡可能是过量水平,不适当水平或正常水平,但是这个水平是不适当的或不期望的。根据这里的详细描述,有很多以存在一定程度的细胞编程性细胞死亡为特征的病症,例如,心肌或脑组织梗塞,或者自身免疫和其他炎症疾病,或者病毒疾病,例如AIDS,或神经退化疾病,例如早老性痴呆或帕金森病,或者急性实体器官或骨髓移植排异,或者化疗或放疗引起的组织损伤(‘粘膜炎’)或瘤,如肿瘤。

[0086] 虽然本发明的优选实施方案涉及筛选编程性细胞死亡的存在,这是特定疾病病症启动的指征,还可能发生其中对其筛选细胞编程性细胞死亡水平的降低或不存在编程性细胞死亡的临床情形。后一种情形在例如对个体监测医疗性治疗方案进程和编程性细胞死亡水平指示接受治疗的疾病向减轻状态发展时存在。还应该理解在某些情况下细胞编程性细胞死亡事件不存在是疾病病症发生的指征。例如,在正常胸腺细胞发育过程中,在阳性和阴性选择作用过程中经历编程性细胞死亡的胸腺中存在大部分胸腺细胞,为了发生自身/非自身辨别力这是必需的。因此,青少年胸腺中不存在正常水平的细胞编程性细胞死亡事件是孩子倾向于发生自身免疫病症的指征。因此应该理解,虽然本发明可能在为了能诊断疾病病症的筛选特定细胞编程性细胞死亡事件的存在中大量地应用,然而本发明方法能应用于筛选缺乏编程性细胞死亡事件,这种情况指示发生某些疾病病症的发生或倾向。本发明的方法还可以用于筛选在监测疾病病症或治疗性或预防性治疗方案中细胞编程性细胞死亡的水平的变化。

[0087] 因此,本发明的另一方面涉及对受试者诊断或监测以异常的不期望的或者另外不

适当的细胞编程性细胞死亡为特征的病症的方法,所述方法包括用针对所述胞核分子或者其抗原决定簇或表位的胞核分子-结合有效量的相互作用分子接触所述受试者或来自所述受试者生物样品的细胞或细胞提取物,并且定性或定量测定胞核分子-免疫活性分子复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是细胞编程性细胞死亡的指征。

[0088] 优选地,所述胞核分子是La。

[0089] 优选地,所述相互作用分子是免疫活性分子,更优选地是抗-La抗体,例如抗-La单克隆抗体。

[0090] 最优选地,所述非胞核定位是胞外定位,并且更优选地,在编程性细胞死亡细胞的胞质中或者编程性细胞死亡细胞形成的编程性细胞死亡体中。

[0091] 在另一个优选的实施方案中,所述病症是心肌或脑组织梗塞,或者自身免疫和其他炎症疾病,病毒疾病,例如AIDS,或神经退化疾病,例如早老性痴呆或帕金森病,急性实体器官或骨髓移植排异,化疗或放疗引起的组织损伤('粘膜炎')或瘤,如肿瘤。

[0092] 在最优选的实施方案中,本发明涉及对受试者诊断或监测肿瘤症状的方法,所述方法包括用指向所述La或者其抗原决定簇或表位的La-结合有效量的免疫活性分子接触所述受试者或来自所述受试者生物样品的细胞或细胞提取物,并且定性或定量测定La-免疫活性分子复合体形成,其中所述复合体的非胞核定位是细胞编程性细胞死亡的指征,并且所述细胞编程性细胞死亡是所述肿瘤病症的指征。

[0093] 优选地,所述肿瘤是中枢神经系统瘤,视网膜母细胞瘤,成神经细胞瘤和其他儿科瘤,头颈癌(例如鳞状细胞癌),乳房和前列腺癌,肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌),肾癌(例如肾细胞腺癌),食管胃癌,肝细胞癌,胰管胆汁瘤形成(例如腺癌胰腺内分泌瘤),结肠直肠癌,宫颈癌和肛门癌,子宫和其他生殖道癌,尿道癌(例如输尿管和膀胱癌),胚细胞肿瘤(例如睾丸胚细胞肿瘤或卵巢胚细胞肿瘤),卵巢癌(例如卵巢上皮癌),未知的原发癌,人免疫缺陷相关恶性肿瘤(例如Kaposi's肉瘤),淋巴瘤,白血病,恶性黑素瘤,肉瘤,内分泌瘤(例如甲状腺瘤),间皮瘤和其他胸膜肿瘤,神经内分泌肿瘤和癌样肿瘤。

[0094] 最优选地,所述免疫活性分子是抗体,更优选是单克隆抗体。

[0095] 这里关于"受试者"应该理解包括人,灵长类,家畜动物(例如绵羊,猪,牛,马,驴),实验室试验动物(例如小鼠,兔子,大鼠,豚鼠),陪伴动物(例如狗,猫)和圈养的野生动物(例如狐狸,袋鼠,鹿)。优选地,哺乳动物是人。

[0096] 应用抗体特别是单克隆抗体、例如上文提到的那些检测胞核分子例如La是本发明优选的方法。抗体可以通过任何方法制备。例如,对于检测人La,人-人单克隆抗体可以来自B细胞,已经从产生抗-La自身抗体的患者获得这种物质,因为它们患有系统自身免疫疾病,例如全身红斑狼疮(SLE)或Sjogren's综合征(Ravirajan等Lupus 1(3):157-165,1992)。抗体一般得自非人哺乳动物,但是不是必须的,例如灵长类动物,家畜动物(例如绵羊,猪,牛,山羊,马),实验室试验动物(例如小鼠,大鼠,兔子,豚鼠),和陪伴动物(例如狗,猫)。一般情况下,体外对细胞或活组织检查组织进行以抗体为基础的测定。然而,如果抗体被适当地去免疫,在人应用、人源化情况下,则用例如胞核标记对抗体标记对患者施用,并且通过放射学技术测定胞核标记物聚积的位点。因此认为La抗体是细胞编程性细胞死亡定向试剂。因此,本发明延伸至用于人和非人患者细胞编程性细胞死亡成像的抗体的去免疫形式。下面对此作进一步描述。

[0097] 因此,本发明提供用于体内对La或者对细胞编程性细胞死亡成像的免疫测定的抗体,特别是单克隆抗体。目前可获得的抗体包括SW3和3B9。

[0098] 关于抗体La抗体的产生,需要从生物样品提取这种分子,不管是从动物包括人组织还是从通过重组方法制备的细胞培养物。通过任何合适的方法能从生物样品分离La。例如,分离可以获得下面的一项或多项好处:La表面电荷性质,大小,密度,生物学活性及其对另一个个体的亲和性(例如与之结合或者另外缔合的另一种蛋白质或化合物)。如此,例如,通过下面一种或几种技术可以实现从生物液体分离La:超离心,离子交换色谱法(例如阴离子交换色谱法,阳离子交换色谱法),电泳(例如聚丙烯酰胺凝胶电泳,等电聚焦),大小分离(例如,凝胶过滤,超滤)和亲和性介导的分离(例如免疫亲和分离,包括但不限于,磁珠分离,例如Dynabead™分离,免疫色谱法,免疫沉淀)。根据研究的La或者获得La的组织的生物活性或物理性质,可以选择使用的分离技术。

[0099] 优选地,从生物液体分离的La保留了蛋白质上构象表位,因此,适当避免引起酶变性的技术。本领域技术人员认识到保持或尽可能近地模拟La特有生理条件的重要性(例如获得La的生物液体),以确保暴露给动物的La上的抗原决定簇或活性位点结构与天然蛋白质的相同。这保证在免疫动物体内产生识别天然蛋白质的合适的抗体。在优选的实施方案中,利用亲和分离,凝胶过滤和超滤中的一种或几种从生物液体分离La。

[0100] 利用标准方法能进行免疫接种和接着的单克隆抗体的产生,例如Kohler和Milstein,Nature256:495-499,1975;Kohler和Milstein,Eur.J.Immunol.6(7):511-519,1976;Coligan等,Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,Inc.,1991-1997,或Toyama等,"Monoclonal Antibody,Experiment Manual",Kodansha Scientific,1987出版所描述的。本质上,通过标准方法用含有La的生物液体对动物免疫,制备产生抗体的细胞,特别是产生抗体的体细胞(例如B淋巴细胞)。然后从免疫的动物取出这些用于无限繁殖。

[0101] 使用La的片段产生抗体的情况下,需要首先将其与载体偶联。所谓"载体"意思是非免疫原性或免疫原性不好的免疫原性物质(例如半抗原)天然或人工地与之连接以增强其免疫原性的一般高分子量的任何物质。

[0102] 利用本领域公知的方法可以进行产生抗体的细胞的无限繁殖。例如,通过使用Epstein-Barr病毒(EBV)的方法可以实现无限繁殖(Kozbor等,Methods in Enzymology121:140,1986)。在优选的实施方案中,利用细胞融合方法使产生抗体的细胞无限繁殖。(描述于Coligan等,1991-1997,上文)。这项技术广泛用于单克隆抗体的制备。在该方法中,有效产生抗体的产生体抗体(somatic antibody)的细胞、特别是B细胞与骨髓瘤细胞系融合。这些体细胞可以来自有循环La-反应性抗体的人和原始动物优选啮齿类动物、例如小鼠和大鼠的淋巴结、脾和外周血。小鼠脾细胞是特别有用的。然而使用大鼠、兔子、绵羊或山羊细胞或者来自其他动物物种的细胞代替也是可能的。

[0103] 从淋巴细胞瘤制备特定的骨髓瘤细胞系用于制备杂交瘤的融合方法(Kohler和Milstein,1976,上文;Shulman等,Nature276:269-270,1978;Volket等,J.Virol.42(1J:220-227,1982)。培养这些细胞系有至少三个原因。第一是有利于从没有融合的和类似地无限自身繁殖的骨髓瘤细胞选择融合的杂交瘤。通常,这通过使用带有酶缺陷的骨髓瘤来实现,所述酶缺陷使得它们不能在支持杂交瘤生长的某些选择性培养基中生长。第二个原因

是由淋巴细胞肿瘤细胞产生它们自身抗体的固有能力产生的。为了减少杂交瘤产生肿瘤细胞抗体,使用不能产生内源轻或重免疫球蛋白链的骨髓瘤细胞系。选择这些细胞系的第三个原因是它们对于融合的适应性和效率。

[0104] 很多杂交瘤细胞系可以用于融合细胞杂合体的产生,包括,例如P3X63-Ag8, P3X63-AG8.653, P3/NS1-Ag4-1(NS-1), Sp2/0-Ag14和S194/5.XX0.Bu.1。**Köhler**和Milstein(1976,上文)描述了P3X63-Ag8和NS-1细胞系。Shulman等(1978,上文)开发了Sp2/0-Ag14骨髓瘤细胞系。Trowbridge, J. Exp. Med. 148(1). 313-323, 1978报道了S194/5.XX0.Bu.1细胞系。

[0105] 产生抗体的脾或淋巴结细胞和骨髓瘤细胞的制备方法通常涉及在促进细胞膜融合的物质(化合物,病毒或电)的存在下以10:1的比例分别混合体细胞和骨髓瘤细胞(但是该比例也可以从大约20:1至大约1:1变化)。融合方法已有描述(Kohler和Milstein, 1975, 上文; 1976, 上文; Gefter等, Somatic Cell Genet. 3. 231-236, 1977; Volk等, 1982, 上文)。那些研究人员使用的促进融合的试剂是Sendai病毒和聚乙二醇(PEG)。

[0106] 因为融合方法以非常低的频率产生成活的杂合体(例如当脾用作体细胞源时,从粗略的每 1×10^5 脾细胞只获得一个杂合体),优选具有从保留的没有融合的细胞,特别是没有融合的骨髓瘤细胞选择融合细胞杂合体的方法。从其他产生的融合细胞杂合体检测期望的产生抗体的杂交瘤的方法也是必需的。一般情况下,通过在支持杂交瘤生长但是阻止正常情况下持续无限分裂的未融合骨髓瘤细胞生长的培养基中培养细胞,实现融合细胞杂合体的选择。融合中使用的体细胞不保留在体外培养物中长期生存力,因此没有造成问题。在本发明的实施例中,使用没有次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶的骨髓瘤细胞(HPRT-阴性)。在次黄嘌呤/氨基喋呤/胸苷(HAT)培养基,一种其中融合细胞杂合体由于脾细胞的HPRT-阳性基因型而存活的培养基中进行针对这些细胞的选择。使用能针对支持基因型有效杂合体生长的培养基进行选择是具有不同基因缺陷(药物灵敏性等)的骨髓瘤也是可能的。

[0107] 选择性培养融合细胞杂合体需要几周。在这个时期早期,需要鉴定产生期望的抗体的那些杂合体,使得可以接着将它们克隆和繁殖。一般情况下,获得的10%左右的杂合体产生期望的抗体,而大约1至大约30%的范围是不常见的。通过几种标准分析方法中的任何一种能实现产生抗体的杂合体的检测,包括酶联免疫测试法和放射免疫分析技术,例如,描述于Kennet等(编著)Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, pp. 376-384, Plenum Press, New York, 1980, 以及通过FACS分析。

[0108] 一旦选择了期望的融合细胞杂合体并且克隆到各个产生抗体的细胞系中,可以以两种标准方法的任一种繁殖各个细胞系。能将杂交瘤细胞的悬浮液注射给组织相容动物。接受注射的动物然后产生肿瘤,其分泌融合细胞杂合体产生的特异单克隆抗体。抽出动物的体液,例如血清或腹水液,提供高浓度单克隆抗体。或者,可以在试验培养容器中体外繁殖各个细胞系。通过倾析、过滤或离心以及随后的纯化能收获含有高浓度单一特异性单克隆抗体的培养物。

[0109] 通过任何合适的免疫检测方法对细胞系分析它们检测La的特异性。例如,将细胞系按等份分到数个孔中并且保温并且通过酶联免疫测试法(ELISA),间接荧光抗体技术,等等,分析各个孔中的上清液。鉴定产生能识别靶物La但是不识别非靶物表位的单克隆抗体的细胞系,然后直接体外培养或者注射给组织相容性动物,形成肿瘤并且产生,收集和纯化

需要的抗体。

[0110] 这些抗体是La特异性的。这意味着,抗体能从其他分子区分La。可以使用更广谱的抗体,条件是它们与正常细胞中的分子不交叉反应。

[0111] 在优选的实施方案中,主体抗体是抗-人La单克隆抗体,8G3和9A5(Bachmann等, Proc Natl Acad Sci USA83(20):7770-7774,1986),抗-人La单克隆抗体(mAb),La1B5(Mamula等,J Immunol1143(9):2923-2928,1989),抗-人La单克隆抗体(Carmo-Fonseca等, Exp Cell Res185(1):73-85,1989),抗-人和抗-牛La单克隆抗体,SW1,SW3和SW5(Pruijn等,Eur J Biochem232(2):611-619,1995),抗-人和抗-啮齿动物La mAb,La4B6(Troster等,J Autoimmunity8(6):825-842,1995)或抗-人和抗-鼠La mAb,3B9(Tran等,Arthritis Rheum46(1):202-208,2002)或者其衍生物、同系物、类似物、化学等价物、突变体或模拟物。

[0112] 还应该理解,本发明延伸至免疫活性分子和表达主体免疫活性分子的细胞系,特别是表达单克隆抗体的杂交瘤。

[0113] 单克隆抗体预计用于体内成像或治疗时,需要对已经导入的宿主(例如人)去免疫。去免疫方法可以采用多种形式中的任何一种,包括与根据本发明制备的单克隆抗体具有相同或相似特异性的嵌合抗体的制备。嵌合抗体是典型地通过基因工程从属于不同物种的免疫球蛋白可变区和恒定区基因构建其轻链和重链基因的抗体。因此,根据本发明,一旦获得产生期望的单克隆抗体的杂交瘤,则利用技术产生种间(interspecific)单克隆抗体,其中一个物种的结合区与另一种物种的抗体的非结合区结合(Liu等,Proc Natl Acad Sci USA84:3439-3443,1987)。例如,来自非人(例如鼠)单克隆抗体的互补决定区(CDRs)能被接枝到人抗体上,从而将鼠抗体人源化(欧洲专利公开No.0239400;Jones等,Nature321:522-525,1986;Verhoeyen 等,Science239:1534-1536,1988;Richmann等,Nature332:323-327,1988)。在这种情况下,去免疫方法对于人是特异性的。更特别地,CDRs能被接枝到有或没有人恒定区的人抗体可变区上。提供CDRs的非人抗体一般称作“供体”,提供构架的人抗体一般称作“受者”。不需要存在恒定区,但是如果存在,它们必须与人免疫球蛋白恒定区基本上相同,即至少大约85-90%、优选大约95%或更多同一性。因此,除了可能的CDRs,人源化抗体的所有部分与天然人免疫球蛋白序列相应部分基本上相同。因此,“人源化抗体”是包含人源化轻链和人源化重链的抗体。认为供体抗体通过“人源化作用”过程而被“人源化”,因为预期得到的人源化抗体与抗原结合,其与提供CDRs的供体抗体是一样的。这里所指“人源化”包括指对特定宿主去免疫的抗体,在这种情况下,是人宿主。

[0114] 应该理解去免疫抗体可以具有另外的保守氨基酸取代作用,这种取代对抗原结合或其他免疫球蛋白功能基本上没有影响。可以根据表1进行举例的保守性取代。

[0115] 表1

[0116] 表1

[0117]

原有的残基	举例的取代
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln,His

Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0118] 可以用来制备根据本发明的去免疫抗体的举例的方法描述于,例如,参考文献 Richmann等,1988,上文;欧洲专利公开No.0239400;Chou等(美国专利No.6,056,957); Queen等(美国专利No.6,180,370);Morgan等(美国专利No.6,180,377)。

[0119] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及具有对于被抗La单克隆抗体识别的表位有特异性的去免疫抗体分子,其中所述去免疫抗体的可变区的一个CDRs来自抗La所述单克隆抗体,并且去免疫抗体分子保留的免疫球蛋白衍生部分来自抗体被去免疫化的宿主的免疫球蛋白或者其类似物。

[0120] 本发明的这个方面涉及非人抗体构架区的操作。

[0121] 本发明延伸至仍保留对La的特异性的主体抗体的突变体、类似物和衍生物。

[0122] 术语“突变体”或“衍生物”包括一个或几个氨基酸取代,加入和/或缺失。

[0123] 根据这里使用的,术语“CDR”包括覆盖分子的结合部分上存在的桥的抗体构架区的可变部分中的三个轻链和三个重链区的CDR结构环。这些环具有特征性典型结构(Chothia等,J Mol.Biol.196:901,1987;Chothia等,J.Mol.Biol.227:799,1992)。

[0124] 所谓“构架区”意思是免疫球蛋白轻链或重链可变区,其中插入三个高变区,也称作CDRs。已经精确确定构架区和CDRs的区域(参见,例如,Kabat等,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,U.S.Department of Health and Human Services,1983)。不同轻链或重链的构架区序列在一种物种中是相对保守的。根据这里使用的,“人构架区”是与天然存在的人免疫球蛋白的构架区基本上相同的构架区(大约85%或更高,通常90-95%或更高)。抗体构架区是构成轻链和重链的联合构架区,用来决定和排列CDRs。CDRs主要负责与La表位结合。

[0125] 根据这里使用的,术语“重链可变区”意思是长度有大约110至125个氨基酸残基的多肽,其氨基酸序列相应于从重链的氨基末端(N-末端)氨基酸残基起始的本发明的单克隆抗体的重链的氨基酸序列。同样,术语“轻链可变区”意思是长度有大约95至130个氨基酸残

基的多肽,其氨基酸序列相应于从轻链的氨基末端(N-末端)氨基酸残基起始的本发明的单克隆抗体的轻链的氨基酸序列。 NH_2 -末端(大约110个氨基酸)的可变区基因和 COOH -末端的 κ 或 λ 恒定区基因编码全长免疫球蛋白“轻链”(大约25Kd或214个氨基酸)。类似地,可变区基因(大约116个氨基酸)和其他上述恒定区基因中的一个,例如 γ (编码大约330个氨基酸)编码全长免疫球蛋白“重链”(大约50Kd或446个氨基酸)。

[0126] 术语“免疫球蛋白”或“抗体”在这里用来指由实质上由免疫球蛋白基因编码的一个或多个多肽构成的蛋白质。识别的免疫球蛋白基因包括 κ , λ , α , γ (IgG₁,IgG₂,IgG₃,IgG₄), δ , ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。免疫球蛋白的一种形式构成抗体的基础结构单位。这个形式是四聚体,并且由两个相同的免疫球蛋白链对构成,每一对具有一个轻链和一个重链。在每一对中,轻链和重链可变区一起负责结合抗原,恒定区负责抗体效应子功能。除了抗体之外,免疫球蛋白可以以各种其他形式存在,包括,例如,Fv,Fab,Fab'和(Fab')₂。

[0127] 本发明还涉及通过本发明的方法制备的单克隆抗体的片段的应用和产生,包括,例如,Fv,Fab,Fab'和F(ab')₂片段。这样的片段可以通过标准方法,例如Coligan等(1991-1997,上文)描述的方法,来制备。

[0128] 本发明还涉及具有和本发明的单克隆抗体相同或相似特异性的合成的或重组的抗原-结合分子。这种类型的抗原-结合分子可以包含合成稳定化的Fv片段。这种类型的例示的片段包括单链Fv片段(sFv,常常称作scFv),其中使用肽接头使V_H结构域的N末端或C末端分别与V_L结构域的C末端或N末端桥接。ScFv没有全抗体的所有的恒定部分,并且不能激活补体。用于连接V_H和V_L结构域的合适的肽接头是使得V_H和V_L结构域折叠成具有与衍生出Fv片段的全抗体的抗原结合位点相似的三维结构的抗原结合位点的多肽单链。通过美国专利No4,946,778公开的方法可以获得具有期望性质的接头。然而,在某些情况下不存在接头,例如,根据Krebber等(Krebber等,J.Immunol.Methods201(1).35-55,1997)公开的方法可以制备ScFvs。或者,可以通过美国专利No5,091,513,欧洲专利No239,400或者Winter和Milstein(Winter和Milstein,Nature349:293,1991)和Plckthun等(Plckthun等,In Antibody engineering.A practical approach203-252,1996)的文章描述的方法制备它们。

[0129] 或者,合成的稳定的Fv片段包含二硫化物稳定的Fv(dsFv),其中半胱氨酸残基导入V_H和V_L结构域,使得在全折叠Fv分子中,两个残基之间形成二硫键。例如(Glockshuber等,Biochem.29:1363-1367,1990;Reiter等,Biochem.33:5451-5459,1994;Reiter等,Cancer Res.54:2714-2718,1994;Reiter等,J.Biol.Chem.269:18327-18331,1994;Webber等,Mol.Immunol.32.249-258,1995)中描述了制备dsFv的合适方法。

[0130] 还涉及的合成或重组抗原-结合分子是单一可变区结构域(称作dAbs),例如,公开于(Ward等,Nature341.544-546,1989;Hamers-Casterman等,Nature363.-446-448,1993;Davies&Riechmann,FEBS Lett.339.285-290,1994)。

[0131] 或者,合成或重组抗原-结合分子可以包括“小体(minibody)”。在这一点上,小体是全抗体的小变型,它编码全抗体的单链基本元件。适当地,抗体由与免疫球蛋白分子的绞合区和CH3结构域融合的天然抗体的V_H和V_L结构域构成,例如,如美国专利No5,837,821中公开的。

[0132] 在另一个实施方案中,合成或重组抗原-结合分子可以包括非免疫球蛋白衍生的蛋白质构架。例如,可以参考(Ku&Schutz,Proc.Natl.Acad.Sci.USA92.6552-6556,1995),该文献公开了具有两个随机产生CDRs选用于抗原结合的环的四螺旋束蛋白质细胞色素b562。

[0133] 合成或重组抗原-结合分子可以是多价的(即具有多于一个的抗原结合位点)。这样的多价分子可以对于一个或几个抗原是特异性的。通过两个抗体片段通过含有半胱氨酸的肽二聚体化可以制备这种类型的多价分子,例如,公开于(Adams等,Cancer Res.53:4026-4034,1993;Cumber等,J.Immunol.149:120-126,1992)。或者,通过使抗体片段与天然存在的二聚体两亲性螺旋融合(Plunckthun,Biochem.31:1579-1584,1992)或者通过使用优先杂二聚化的(Kostelny等,J.Immunol.148:1547-1553,1992)结构域(例如亮氨酸拉链jun和fos)可以促进异二聚体化。

[0134] 本发明进一步涉及主体抗体中氨基酸的化学类似物。例如如果需要对受试者施药,氨基酸的化学类似物的应用对于稳定分子是特别有用的。这里涉及的氨基酸的类似物包括但不限于,侧链的修饰,肽,多肽或蛋白质合成中非天然氨基酸和/或它们的衍生物的插入,以及交联剂和对蛋白质分子或它们的类似物强加构象约束的其他方法的使用。

[0135] 本发明涉及的侧链修饰的例子包括例如通过与醛反应接着用NaBH₄还原的还原性烷基化作用对氨基的修饰;用甲基乙酰亚胺的脒化作用;使用乙酸酐的乙酰化作用;使用氰酸盐对氨基的氨基甲酰化作用;使用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)对氨基的三硝基苄基化作用;使用琥珀酸酐和四氢化邻苯二甲酸酐对氨基的酰化作用;和使用吡哆醛-5-磷酸酯对赖氨酸的吡哆化(pyridoxylation)作用后接着用NaBH₄还原。

[0136] 使用象2,3-丁二酮,苯乙二醛和乙二醛这样的试剂通过形成杂环缩合产物可以修饰精氨酸残基的胍基。

[0137] 通过经O-酰基异脒形成的碳化二亚胺活化之后接着进行衍生化作用例如形成相应的酰胺可以修饰羧基。通过例如下面的方法可以修饰Sulphydryl基团:使用碘代乙酸或碘代乙酰胺的羧甲基化作用;氧化过甲酸至磺基丙氨酸;与其他硫醇化合物形成混合二硫物;与马来酰亚胺、马来酸酐或其他取代的马来酰亚胺反应;使用4-氯正汞基苯甲酸酯、4-氯正汞基苯磺酸、苯基汞氯化物、2-氯正汞基-4-硝基苯酚和其他汞制剂形成汞衍生物;在碱性pH下用氰酸盐的氨基甲酰化作用。

[0138] 通过,例如,用N-溴琥珀酰亚胺的氧化作用或用2-羟基-5-硝基苄基溴或sulphenyl halide对吡啶环的烷基化作用可以修饰色氨酸残基。另一方面,可以通过用四硝基甲烷的硝基化作用形成3-硝基酪氨酸衍生物来修饰酪氨酸残基。

[0139] 通过用碘乙酸衍生物进行烷基化作用或用焦碳酸二乙基酯进行N-乙酯基化作用可以实现对组氨酸残基咪唑环的修饰。

[0140] 在肽合成中插入非天然氨基酸和衍生物的例子包括但不限于,使用正亮氨酸,4-氨基丁酸,4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸,6-氨基己酸,叔丁基甘氨酸,正缬氨酸,苯基甘氨酸,鸟氨酸,肌氨酸,4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸,2-噻吩基丙氨酸和/或氨基酸的D-异构体。表2给出这里涉及的非天然氨基酸的目录。

[0141] 表2

[0142]

非常见氨基酸	代码	非常见氨基酸	代码
α -氨基丁酸	Abu	L-N-甲基丙氨酸	Nmala
α -氨基- α -甲基丁酸酯	Mgab	L-N-甲基精氨酸	Nmarg
氨基环丙烷羧酸酯	Cpro	L-N-甲基天冬酰胺	Nmasn
		L-N-甲基天冬氨酸	Nmasp
氨基异丁酸	Aib	L-N-甲基半胱氨酸	Nmcys
氨基降冰片基羧酸酯	Norb	L-N-甲基谷氨酰胺	Nmgln
		L-N-甲基谷氨酸	Nmglu
环己基丙氨酸	Chexa	L-N-甲基组氨酸	Nmhis
环戊基丙氨酸	Cpen	L-N-甲基异亮氨酸	Nmile
D-丙氨酸	Dal	L-N-甲基亮氨酸	Nmleu
D-精氨酸	Darg	L-N-甲基赖氨酸	Nmlys
D-天冬氨酸	Das	L-N-甲基甲硫氨酸	Nmmet
D-半胱氨酸	Dcys	L-N-甲基正亮氨酸	Nmnle
D-谷氨酰胺	Dgln	L-N-甲基正缬氨酸	Nmnva
D-谷氨酸	Dglu	L-N-甲基鸟氨酸	Nmorn
D-组氨酸	Dhis	L-N-甲基苯丙氨酸	Nmphe
D-异亮氨酸	Dile	L-N-甲基脯氨酸	Nmpro
D-亮氨酸	Dleu	L-N-甲基丝氨酸	Nmser
D-赖氨酸	Dlys	L-N-甲基苏氨酸	Nmthr
D-甲硫氨酸	Dmet	L-N-甲基色氨酸	Nmtrp
D-鸟氨酸	Dorn	L-N-甲基酪氨酸	Nmtyr
D-苯丙氨酸	Dphe	L-N-甲基缬氨酸	Nmval
D-脯氨酸	Dpro	L-N-甲基乙基甘氨酸	Nmetg
D-丝氨酸	Dser	L-N-甲基叔丁基甘氨酸	Nmtbug

[0143]

D-苏氨酸	Dthr	L-正亮氨酸	Nle
D-色氨酸	Dtrp	L-正缬氨酸	Nva
D-酪氨酸	Dtyr	α -甲基-氨基异丁酸酯	Maib
D-缬氨酸	Dval	α -甲基- γ -氨基丁酸酯	Mgab
D- α -甲基丙氨酸	Dmala	α -甲基环己基丙氨酸	Mchexa
D- α -甲基精氨酸	Dmarg	α -甲基环戊基丙氨酸	Mcpen
D- α -甲基天冬酰胺	Dmasn	α -甲基- α -萘基丙氨酸	Manap
D- α -甲基天冬氨酸	Dmasp	α -甲基青霉胺	Mpen
D- α -甲基半胱氨酸	Dmcys	N-(4-氨基丁基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基谷氨酰胺	Dmgln	N-(2-氨基乙基)甘氨酸	Naeg
D- α -甲基组氨酸	Dmhis	N-(3-氨基丙基)甘氨酸	Norn
D- α -甲基异亮氨酸	Dmile	N-氨基- α -甲基丁酸酯	Nmaabu
D- α -甲基亮氨酸	Dmleu	α -萘基丙氨酸	Anap
D- α -甲基赖氨酸	Dmlys	N-苄基甘氨酸	Nphe
D- α -甲基甲硫氨酸	Dmmet	N-(2-氨基甲酰乙基)甘氨酸	Ngln
D- α -甲基鸟氨酸	Dmorn	N-(氨基甲酰甲基)甘氨酸	Nasn
D- α -甲基苯丙氨酸	Dmphe	N-(2-羧乙基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基脯氨酸	Dmpro	N-(羧甲基)甘氨酸	Nasp
D- α -甲基丝氨酸	Dmser	N-环丁基甘氨酸	Ncbut
D- α -甲基苏氨酸	Dmthr	N-环庚基甘氨酸	Nchep
D- α -甲基色氨酸	Dmtrp	N-环己基甘氨酸	Nchex
D- α -甲基酪氨酸	Dmtty	N-环癸基甘氨酸	Ncdec
D- α -甲基缬氨酸	Dmval	N-环十二烷基甘氨酸	Ncdod
D-N-甲基丙氨酸	Dnmala	N-环辛基甘氨酸	Ncoct
D-N-甲基精氨酸	Dnmarg	N-环丙基甘氨酸	Ncpro
D-N-甲基天冬酰胺	Dnmasn	N-环十一烷基甘氨酸	Ncund
D-N-甲基天冬氨酸	Dnmasp	N-(2,2-二苯基乙基)甘氨酸	Nbhm
D-N-甲基半胱氨酸	Dnmcys	N-(3,3-二苯基丙基)甘氨酸	Nbhe
D-N-甲基谷氨酰胺	Dnmgln	N-(3-胍基丙基)甘氨酸	Narg
D-N-甲基谷氨酸	Dnmglu	N-(1-羟乙基)甘氨酸	Nthr
D-N-甲基组氨酸	Dnmhis	N-(羟乙基)甘氨酸	Nser
D-N-甲基异亮氨酸	Dnmile	N-(咪唑基乙基)甘氨酸	Nhis
D-N-甲基亮氨酸	Dnmleu	N-(3-吡啶基乙基)甘氨酸	Nhtrp
D-N-甲基赖氨酸	Dnmlys	N-甲基- γ -氨基丁酸酯	Nmgabu
N-甲基环己基丙氨酸	Nmchexa	D-N-甲基甲硫氨酸	Dnmmet
D-N-甲基鸟氨酸	Dnmorn	N-甲基环戊基丙氨酸	Nmcpen
N-甲基甘氨酸	Naia	D-N-甲基苯丙氨酸	Dnmphe
N-甲基氨基异丁酸酯	Nmaib	D-N-甲基脯氨酸	Dnmpro
N-(1-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dnmser

[0144]

N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nleu	D-N-甲基苏氨酸	Dnmthr
D-N-甲基色氨酸	Dnmtrp	N-(1-甲基乙基)甘氨酸	Nval
D-N-甲基酪氨酸	Dnmtyr	N-甲基- α -萘基丙氨酸	Nmanap
D-N-甲基缬氨酸	Dnmval	N-甲基青霉胺	Nmpen
γ -氨基丁酸	Gabu	N-(对-羟基苯基)甘氨酸	Nhtyr
L-叔丁基甘氨酸	Tbug	N-(硫甲基)甘氨酸	Ncys
L-乙基甘氨酸	Etg	青霉胺	Pen
L-高苯丙氨酸	Hphe	L- α -甲基丙氨酸	Mala
L- α -甲基精氨酸	Marg	L- α -甲基天冬酰胺	Masn
L- α -甲基天冬氨酸	Masp	L- α -甲基-叔丁基甘氨酸	Mtbug
L- α -甲基半胱氨酸	Mcys	L-甲基乙基甘氨酸	Metg
L- α -甲基谷氨酰胺	Mgln	L- α -甲基谷氨酸	Mglu
L- α -甲基组氨酸	Mhis	L- α -甲基高苯丙氨酸	Mhphe
L- α -甲基异亮氨酸	Mile	N-(2-甲基硫基乙基)甘氨酸	Nmet
L- α -甲基亮氨酸	Mleu	L- α -甲基赖氨酸	Mlys
L- α -甲基甲硫氨酸	Mmet	L- α -甲基正亮氨酸	Mnle
L- α -甲基正缬氨酸	Mnva	L- α -甲基鸟氨酸	Morn
L- α -甲基苯丙氨酸	Mphe	L- α -甲基脯氨酸	Mpro
L- α -甲基丝氨酸	Mser	L- α -甲基苏氨酸	Mthr
L- α -甲基色氨酸	Mtrp	L- α -甲基酪氨酸	Mtyr
L- α -甲基缬氨酸	Mval	L-N-甲基高苯丙氨酸	Nmhpe
N-(N-(2,2-二苯基乙基)氨基甲酰甲基)甘氨酸	Nnbhm	N-(N-(3,3-二苯基丙基)氨基甲酰甲基)甘氨酸	Nnbhe
1-羧基-1-(2,2-二苯基乙基氨基)环丙烷	Nmbc		

[0145] 交联剂可以用来,例如,稳定3D构象,使用同型双功能交联剂,例如具有其中n=1至n=6(CH₂)_n间隔基团的双功能亚氨酯,戊二醛,N-羟基琥珀酰亚胺酯和异型双功能试剂,所述试剂通常包含氨基反应部分,例如N-羟基琥珀酰亚胺和其他基团特异性反应部分,例如马来酰亚胺基或二硫基部分(SH)或碳化二亚胺(COOH)。

[0146] 本发明进一步涉及对生物样品检测编程性细胞死亡细胞的分析法,所述分析法包括下面的步骤:-(3)使针对胞核分子或者其抗原决定簇的反应活性分子接触怀疑含有所述胞核分子的生物样品;和

[0147] (4)对步骤(1)中形成的复合体进行信号检测步骤,

[0148] 其中检测非胞核相互作用分子-胞核分子复合体形成是编程性细胞死亡细胞的指征。

[0149] 优选地,所述胞核分子是La。

[0150] 更优选地,所述相互作用分子是免疫活性分子,更优选是抗-La抗体,例如单克隆抗体SW3或3B9。

[0151] 最优选地,所述非-胞核定位是胞外定位,更优选地,定位在编程性细胞死亡细胞的胞质中或者编程性细胞死亡细胞形成的编程性细胞死亡体中。

[0152] 信号检测步骤包括ELISA或者任何其他报道分子为基础的分析法。作为该检测步骤的一部分,首先需要将信号扩大。应该理解这个分析法可以体内或体外进行。

[0153] 为了使编程性细胞死亡细胞接触旁观者-细胞生长阻碍或旁观者-细胞杀伤试剂,即细胞抑制剂或杀细胞试剂,本发明的去免疫单克隆抗体A也可以用于体内编程性细胞死亡成像以及用于定向编程性细胞死亡细胞。

[0154] 抗-La抗体优于目前已知的产物,例如Apomate™(North American Scientific, Inc.),用于体内检测编程性细胞死亡细胞。Apomate™使用放射标记膜联蛋白V来结合编程性细胞死亡细胞,特别是查明癌对化疗的强烈反应。膜联蛋白V结合磷脂酰丝氨酸,其在编程性细胞死亡早期'flip-flops'至外原生质膜小叶。然而,通过Apomate™对化疗引起的肿瘤细胞编程性细胞死亡的检测是易变的,因为给药时间选择是决定性的(Blankenberg等, Clin Cancer Res2002)。时间选择与使用抗-La抗体相比重要性较小,因为抗体使得编程性细胞死亡细胞定向于在癌部位积聚的巨噬细胞。此外,膜联蛋白V抑制体外编程性细胞死亡胸腺细胞的巨噬细胞-介导的吞噬作用,通过抗体结合的红细胞的Fc受体介导的摄入包围它,它有表面-暴露的磷脂酰丝氨酸(Callahan等, Cell Death Different7(7):645-653, 2000;Krahlung等Cell Death Different6(2):183-189,1999)。因此,抗-La抗体调理编程性细胞死亡细胞并且有利于巨噬细胞对它们进行吞噬作用。特别地,使得巨噬细胞定向于诊断和/或治疗目的,如下文更详细描述。因此,相对例如以检测膜联蛋白V为基础的那些目前已知的诊断方法而言,使用抗-La抗体的优势之一是:巨噬细胞对编程性细胞死亡细胞的调理和摄入导致抗体在编程性细胞死亡细胞部位的巨噬细胞中抗体的积累,从而有助于成像。

[0155] 关于成像,报道分子与去免疫单克隆抗体连在一起,然后导入宿主,例如人。通过检测报道分子,能看得见细胞编程性细胞死亡簇,例如与肿瘤相关的那些。一种特别有用的报道分子形式是胞核标记。某些放射性同位素允许通过正电子发射X线断层摄影术(PET)成像,一些配体有利于通过磁共振成像(MRI)检测目标结合。

[0156] 因此,本发明的另一方面涉及对人检测编程性细胞死亡细胞的方法,所述方法包括向所述患者引入用报道分子标记的针对胞核分子或者其抗原决定簇的相互作用分子,使通过标记的相互作用分子通过循环系统或者循环系统的选择部分散播,然后对所述患者施用报道分子检测方法以鉴定相互作用分子的定位。

[0157] 优选地,所述胞核分子是La。

[0158] 更优选地,所述相互作用分子是免疫活性分子,更优选是抗-La抗体。

[0159] 最优选地,所述非-胞核定位是胞外定位,优选地,定位在编程性细胞死亡细胞的胞质中或者编程性细胞死亡细胞形成的编程性细胞死亡体中。

[0160] 优选地,所述编程性细胞死亡细胞是肿瘤特征。

[0161] 优选地,所述肿瘤细胞是中枢神经系统瘤,视网膜母细胞瘤,成神经细胞瘤和其他儿科瘤,头颈癌(例如鳞状细胞癌),乳房和前列腺癌,肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌),肾癌(例如肾细胞腺癌),食管胃癌,肝细胞癌,胰管胆汁瘤形成(例如腺癌胰腺内分泌瘤),结肠直肠癌,宫颈癌和肛门癌,子宫和其他生殖道癌,尿道癌(例如输尿管和膀胱癌),胚细胞肿瘤(例如睾丸胚细胞肿瘤或卵巢胚细胞肿瘤),卵巢癌(例如卵巢上皮癌),未知的原发癌,人免疫缺陷相关恶性肿瘤(例如Kaposi's肉瘤),淋巴瘤,白血病,恶性黑素瘤,肉瘤,内

分泌瘤(例如甲状腺瘤),间皮瘤和其他胸膜肿瘤,神经内分泌肿瘤和癌样肿瘤特征之一。

[0162] 免疫基础La检测方法可以用各种各样的形式。例如,每一个针对特定抗原或癌细胞包括La具有不同特异性的多种抗体在阵列中固定。然后使来自活组织检查的细胞接触抗体阵列并且以固定细胞为基础诊断出肿瘤类型。

[0163] 也可以进行其他更常见的分析法,例如通过ELISA,蛋白质印迹分析,免疫沉淀分析,免疫荧光分析,免疫化学分析或FACS分析。

[0164] 因此,本发明提供对样品检测La或者其片段、变体或衍生物的方法,包括使样品接触抗体或其片段或衍生物,并且检测包含所述抗体和La或其片段、变体或衍生物的复合体,其中La的非胞核定位是编程性细胞死亡的指征。

[0165] 优选地,所述非胞核定位是胞外定位,优选地,定位在编程性细胞死亡细胞的胞质中或者编程性细胞死亡细胞形成的编程性细胞死亡体中。

[0166] 如上所讨论的,可以使用测定复合体形成的任何合适的技术。例如,可以在免疫分析中使用与报道分子缔合的本发明的抗体。这样的免疫分析包括但不限于放射免疫分析法(RIAs),酶联免疫吸附测试法(ELISAs)和免疫色谱技术(ICTs),蛋白质印迹,这些都是本领域技术人员公知的。例如,可以参考“Current Protocols in Immunology”,1994,它公开了可以根据本发明的使用的各种免疫分析法。免疫分析包括竞争测试法。应该理解本发明包括定性和定量免疫分析法。

[0167] 例如美国专利Nos.4,016,043,4,424,279和4,018,653中描述了合适的免疫测试技术。这些包括非竞争型单位点和两-位点测试,以及传统竞争结合测试法。这些测试法还包括指导标记的抗原-结合分子与靶抗原结合,在这种情况下所述抗原是La或其片段。

[0168] 两-位点测试法在本发明的使用是特别有益的。有各种各样的测试法,这些都包括在本发明内。简要地说,在典型的早期测试法中,没有标记的抗原-结合分子例如没有标记的抗体固定在固体底物上,并且将分析的样品接触结合的分子。保温合适时间之后,让抗体-抗原复合体形成足够一段时间,然后加入另一种抗原-结合分子,是用能产生可检测信号的报道分子标记的对抗原特异性的合适的二抗。将没有反应的材料全部清洗掉,并且通过观察报道分子产生的信号来测定抗原的存在。通过简单观察可视信号获得定性结果,或者通过与含有已知量的抗原的对照样品相比较获得定量结果。先前测试法的改变包括同时测试法,其中向结合的抗体同时加入样品和标记的抗体。这些技术是本领域技术人员公知的,包括容易显现的小的改变。

[0169] 在典型的早期测试中,对抗原或者其抗原部分有特异性的一抗与固体表面共价或被动结合。所述固体表面典型地是玻璃或聚合物,最常使用的聚合物是纤维素,聚丙烯酰胺,尼龙,聚苯乙烯,聚氯乙烯或聚丙烯。固体载体可以是管、小球、微片,或者适合进行免疫分析法的任何其他表面。结合方法是本领域公知的,并且一般包括交联共价结合或物理吸附,在用于分析样品的制剂中洗涤聚合物-抗体复合体。然后向固相复合体加入要分析的样品等份并且温育足够一段时间,让存在的抗原与抗体结合。温育一段时间之后,洗涤抗原-抗体复合体并且干燥并且与对于抗原的一部分具有特异性的二抗温育。二抗一般已经与报道分子缔合用来指示二抗与抗原的结合。根据缔合的报道分子测定的,结合的标记的抗体的量和与固定化一抗结合的抗原的量呈正比。

[0170] 另一种方法涉及在生物样品中固定抗原,然后让固定的抗原接触特异性抗体,所

述抗体可以是报道分子标记的或没有标记的。根据靶物的量和报道分子信号强度,通过用抗体直接标记可以检测结合的抗原。或者,让对一抗特异性的标记的二抗接触靶物—抗复合体,形成靶物—抗—二抗三元复合体。通过报道分子发射的信号检测复合体。

[0171] 如上所述,可以理解与抗原—结合分子缔合的报道分子可以包括下面的:

[0172] (a)报道分子与抗体直接连接;

[0173] (b)报道分子与抗体间接连接;即,报道分子与另一种分析试剂连接,其接着与抗体结合;和

[0174] (c)与抗体的随后反应产物连接。

[0175] 报道分子可以从包括下面物质的组中选择:色原体,催化剂,酶,荧光染料,化学发光分子,顺磁离子,镧系离子例如铕(Eu^{3+}),放射性同位素,包括其他胞核标签,半导体量子点(Wu等,Nature Biotechnol2002)和直接目测标记。通过与配对物例如增强绿色荧光蛋白(EGFP)融合可以制备重组抗体—样分子。

[0176] 在直接目测标记情况下,可以使用胶态金属或非金属颗粒,染料颗粒,酶或底物,有机聚合物,胶乳颗粒,脂质体,或者其他含有产生信号的物质等的囊泡。

[0177] 美国专利Nos.U.S.4,366,241,U.S.4,843,000,和U.S.4,849,338描述了大量适合用作报道分子的酶。本发明中使用的合适的酶包括碱性磷酸酶,辣根过氧化物酶,荧光素酶, β -半乳糖苷酶,葡萄糖氧化酶,溶菌酶,苹果酸脱氢酶等等。酶可以单独使用或者与溶液中第二种酶联合使用。

[0178] 合适的荧光染料包括但不限于,荧光素异硫氰酸酯(FITC),四甲基若丹明异硫氰酸酯(TRITC),R-藻红蛋白(RPE)和Texas红。

[0179] 其他举例的荧光染料包括下面文献讨论的那些:Dower等,国际公开No.W093/06121。也可以参考Singer等美国专利No.5,573,909,和Brinkley等美国专利No.5,326,692描述的荧光染料。或者,可以参考美国专利Nos.5,227,487,5,274,113,5,405,975,5,433,896,5,442,045,5,451,663,5,453,517,5,459,276,5,516,864,5,648,270和5,723,218描述的荧光染料。

[0180] 在酶免疫测试法情况下,酶与二抗偶联,一般利用戊二醛或高碘酸盐。然而,容易理解,有本领域技术人员容易获取的各种各样的不同偶联技术。要使用的带有特异性酶的底物一般被选来通过相应的酶水解时产生可检测的颜色变化。合适的酶的例子包括上文描述的那些。还可以使用荧光基质,得到除了上面提到的产色底物的荧光产物。在所有的情况下,酶—标记抗体加给一抗—抗原复合体,使结合,然后洗涤过量的试剂。然后将含有合适底物的溶液加给抗体—抗原—抗体复合体。底物和与二抗连接的酶反应,给出定性可视信号,其可以进一步定量化,通常是分光光度分析法,给出样品中存在的抗原的量的指示。

[0181] 或者,荧光化合物,例如荧光素,若丹明和镧系,铕(EU),可以与抗体化学偶联而不改变它们的结合能力。当通过特定波长光照明激活时,荧光染料—标记的抗体吸附光能,诱发分子应激状态,接着发出用光学显微镜可目测检测的特征颜色的光。让荧光—标记抗体结合一抗—抗原复合体。洗掉没有结合的试剂之后,然后将残留的三元复合体暴露给合适波长的光。观察到的荧光指示感兴趣的抗原的存在。免疫荧光测定法(IFMA)在本领域是确定的并且特别用于本发明方法。然而,也可以使用其他报道分子,例如放射性同位素,化学发光物质或生物发光分子。

[0182] 本发明的方法用作认为有发生以细胞编程性细胞死亡为特征的发展或病症(例如肿瘤)危险的那些个体的一个结束试验或者作为发展的监测器,或者作为针对抑制或者另外减缓这样一种病症进程的治疗性或预防性治疗功效的监测器。在这些情况下,将一类或几类生物样品中La水平的调节作图,是个体状态或目前使用的治疗性或预防性治疗功效的有价值的指标。因此,应该理解本发明的方法延伸至个体相对于它们正常水平(如上文定义的)或者相对于从所述个体的生物样品测定的一个或多个较早标记物水平的标记物水平升高或降低的监测。

[0183] 本发明进一步涉及针对胞核分子的相互作用分子在制备检测来自患者的生物样品中编程性细胞死亡细胞的定量或半定量诊断试剂盒的用途。试剂盒可以带有使用说明书,并且可以是自动或半自动的或者是与自动机器或软件相匹配的形式。

[0184] 优选地,所述胞核分子是La。

[0185] 优选地,所述编程性细胞死亡细胞是编程性细胞死亡肿瘤细胞。

[0186] 不在任何方面限制试剂盒的应用,用于在诊断和研究应用中检测编程性细胞死亡细胞。目前,市场上有很多体外检测编程性细胞死亡的试剂,包括膜联蛋白V,线粒体渗透性染料,AP02.7(仅在编程性细胞死亡期间识别线粒体蛋白质的单克隆抗体),DNA结合荧光染料,例如碘化丙锭和7-氨基放线菌素D(7-AAD),和荧光半胱天冬酶抑制剂。然而,这些试剂不能区别编程性细胞死亡细胞和坏死细胞(H.Lecoeur 等,J Immunol Methods2002),并且需要一种以上来特异性鉴定晚编程性细胞死亡细胞(P.Smolewski等,J.Immunol Methods 2002;Hamel等,Cytometry25(2):173-181,1996)。

[0187] 根据本发明,抗La抗体的产生是针对活性或非活性形式分子的。

[0188] 除了本发明方法的毫无疑问的诊断效益外,精确靶向编程性细胞死亡细胞的能力现在提供以定位和高度定向方式的递送治疗性和/或预防性治疗方法。迄今为止,这样的治疗(经常称作“魔力弹”)还是不可能的。特别地,就肿瘤治疗来说,由于不可能鉴定抗体所针对的合适的肿瘤特异性抗原的事实,定向治疗概念还是不可能的。然而,本发明通过定向对包括受试者肿瘤的编程性细胞死亡细胞实施治疗性或预防性治疗,克服了这些缺点。通过选择能与抗-La免疫活性分子偶联、但是对位于接近编程性细胞死亡细胞的非编程性细胞死亡肿瘤细胞的细胞发挥功能的治疗性或预防性效应子机理,能实现肿瘤的有效杀伤。受试者效应子机理可以采取任何合适形式,但是优选递送毒性分子或另外杀死邻近位置的非编程性细胞死亡肿瘤细胞。

[0189] 此外,象人IgG1和IgG3这样的抗体有利于已经用抗-La抗体调理过的编程性细胞死亡细胞的吞噬作用。不将本发明局限于任何一种理论或作用方式,抗-La抗体变得体内瞄准并且聚积在巨噬细胞或其他有吞噬作用的细胞中。经历编程性细胞死亡的细胞首先分成膜-结合部分或编程性细胞死亡体,其接着被周围的细胞,特别是被已知是巨噬细胞的专业清除剂细胞处理。抗-La抗体体外和体内特异性识别编程性细胞死亡过程中特定阶段的编程性细胞死亡细胞。此外,抗-La抗体优先体内位于巨噬细胞,它吞噬编程性细胞死亡细胞。巨噬细胞对心脏病发作,中风和器官移植排异中发生的组织损伤的愈合有贡献。癌有高含量的已知为肿瘤相关巨噬细胞的巨噬细胞,其可以延迟或促进癌的生长。因此,抗-La抗体作为对用于递送治疗活性技术的载体。

[0190] 因此,本发明的另一方面涉及对受试者治疗性和/或预防性治疗以细胞编程性细

胞死亡为特征的病症的方法,所述方法包括在足以治疗所述病症的时间和条件下,对所述受试者施用有效量的针对胞核分子或者其抗原片段的相互作用分子,所述相互作用分子与治疗性或预防性效应子结构连接、键合或另外缔合。

[0191] 优选地,所述胞核分子是La。

[0192] 更优选地,所述相互作用分子是免疫活性分子,更优选是抗-La抗体。

[0193] 在另一个优选的实施方案中,所述病症是心肌或脑组织梗塞,自身免疫和其他炎症疾病,病毒疾病,例如AIDS,神经退化疾病,例如早老性痴呆或帕金森病,急性实体器官或骨髓移植排异,化疗或放疗引起的组织损伤(‘粘膜炎’)或瘤,如肿瘤。

[0194] 本发明所涉及的肿瘤和肿瘤细胞包括但不限于,中枢神经系统瘤,视网膜母细胞瘤,成神经细胞瘤和其他儿科瘤,头颈癌(例如鳞状细胞癌),乳房和前列腺癌,肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌),肾癌(例如肾细胞腺癌),食管胃癌,肝细胞癌,胰管胆汁瘤形成(例如腺癌胰腺内分泌瘤),结肠直肠癌,宫颈癌和肛门癌,子宫和其他生殖道癌,尿道癌(例如输尿管和膀胱癌),胚细胞肿瘤(例如睾丸胚细胞肿瘤或卵巢胚细胞肿瘤),卵巢癌(例如卵巢上皮癌),未知的原发癌,人免疫缺陷相关恶性肿瘤(例如Kaposi’s肉瘤),淋巴瘤,白血病,恶性黑素瘤,肉瘤,内分泌瘤(例如甲状腺瘤),间皮瘤和其他胸膜肿瘤,神经内分泌肿瘤和癌样肿瘤。

[0195] 关于“胞核分子”,“La”,“免疫活性分子”,“受试者”和“编程性细胞死亡”应该理解具有和上面提到的相同的意义。

[0196] 本发明更特别提供对受试者治疗性和/或预防性治疗肿瘤病症的方法,所述方法包括在足以抑制、减小或另外减量调节肿瘤生长的时间和条件下,对所述受试者施用有效量的针对La或者其抗原部分的免疫活性分子,所述免疫活性分子与治疗性或预防性效应子结构连接、键合或另外缔合。

[0197] 优选地,所述肿瘤病症是恶性肿瘤。

[0198] 关于“效应子结构”应该理解为是指当位于编程性细胞死亡细胞位点时直接或间接治疗组织中的病症、例如减量调节肿瘤细胞生长的任何合适的结构。在这个优选的实施方案中,效应子结构最可能是实现这个结果的蛋白质或非蛋白质分子或者分子的基团。适合在本发明方法中使用的效应子结构的例子包括但不限于:

[0199] (i)已经与细胞因子、趋化因子或发挥诱导或增强免疫应答的一个或几个方面的其他因子,例如巨噬细胞、树突状细胞和/或T细胞激活剂连接,从而增加旁观者杀伤的抗体的应用。例如,趋化性肽,N-甲酰基-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸(FMLP)(Morikawa等,Cancer Immunol Immunother27(1):1-6,1988)和新的细菌脂肽,JBT2002(Shinohara等,J Immunother23(3):321-331,2000)是肿瘤相关巨噬细胞的两种激活剂。

[0200] (ii)与毒素偶联的抗体的应用。

[0201] 关于“毒素”应该理解是指实现提供减小、防止或另外抑制受试者细胞增殖、分化或维持(这里称作所述细胞的“减量调节生长”)的信号的目的的任何合适的蛋白质或非蛋白质分子。所述毒素可以通过各种各样的方法起作用,包括通过与受试者细胞直接接触提供信号或者发射分子或粒子,例如在放射性同位素毒素情况下放射,对受试者细胞提供信号。优选地,毒素是放射性同位素,更优选是在短时间内高度毒性并且有短的半衰期,从而使对周围邻近的非靶物细胞非故意毒性的发生最小化的放射性同位素。最特别地,所述放

放射性同位素是发射放射性同位素的 α 粒子。然而,应该理解,放射性同位素不局限于发射放射性同位素的 α 粒子,而根据临床情况可以包括 β -和 γ -发射放射性同位素。适合在本发明方法中使用的 α -发射放射性同位素的例子包括但不限于,Tb-149或Bi-213。应该理解在本发明方法中使用的毒素可以是纯化、部分纯化或没有纯化的形式。它还形成较大分子的一个成分。毒素可以是天然存在的或者可以合成或重组制备。

[0202] 应该理解落在“毒素”范围内的分子的其他例子包括蓖麻毒素,colicheamicin,前体药物(如抗体-定向前体药物转化酶疗法[ADEPT])和新的生物治疗物质,例如催化抗体。

[0203] 应该理解本发明的方法可以体内或体外进行。体外应用的例子包括但不限于,含有肿瘤细胞的生物样品的体外清除。例如,从患者取出骨髓和/或血液,根据本发明的方法清除并杀死肿瘤细胞,然后输回给患者。目前使用这种方法,但是以较不明显的定向方式,避免与MHC不相容骨髓移植相关的大风险。

[0204] 关于与抗-La,例如抗体或其他免疫活性分子“连接、键合或另外缔合”的效应子结构应该理解是指实现两个分子连接的共价或非共价相互作用机理。这包括但不限于使用肽键,离子键,氢键,范德华力或任何其他相互作用键合机理。

[0205] 关于细胞或肿瘤的“生长”应该理解是指受试者细胞的增殖、分化和/或存活维持,而细胞或肿瘤的“减量调节生长”是指细胞衰老过程或者指减少、防止或抑制受试者细胞的增殖、分化和/或存活维持。在优选的实施方案中,受试者生长是增殖而受试者减量调节是杀死。在这点上,通过对细胞递送致命打击或者对细胞递送诱导细胞编程性细胞死亡信号可以实现杀死细胞。

[0206] 关于“治疗性”或“预防性”“治疗”认为是其广义意义。术语“治疗”不一定暗示受试者得以治疗完全恢复。类似地,“预防性”不必然指受试者最后不感染疾病。因此,治疗和预防包括特定病症征兆的减轻或者防止或另外减小产生特定病症的危险。术语“预防”可以认为是减小特定病症的严重度或起始。“治疗”也可以减小已经存在的病症的严重程度。

[0207] 不将本发明局限于任何理论或作用模式,抗癌治疗通常通过编程性细胞死亡杀死,但是在很多晚期癌症情况下,一些癌细胞抵抗可以通过特定抗癌治疗诱导的编程性细胞死亡。这些编程性细胞死亡-抗性细胞是疾病临床复发的根源,最后杀死晚期癌症的大部分患者和很大一部分早期癌症患者。那些晚期癌症患者表现出相应治疗的最初药征,因为证明体内肿瘤细胞杀伤,如果还使用了另一种非交叉抗性治疗药征,则可以另外赢得存活和生活质量。因此,正如详细描述,使用本发明方法对有应答的癌症患者进行诊断,能鉴定从用治疗性偶联物或杂合融合蛋白补充治疗获益的那些患者。

[0208] 在辅助临床情形下使用抗-La抗体也是有益的。虽然早期乳房和结肠癌通过手术能治愈,但是有明显并且不能治愈的全身复发的风险,因为,原发肿瘤具有某些高风险特征和/或局部淋巴结包含转移的那些患者,可能已经存在了没有检测出的全身微转移。这样,辅助化疗和/或辅助激素治疗(在乳房癌情况下)治愈另外一小部分的这些患者,大概因为成功清除了全身微转移。

[0209] 此外,虽然因为没有血液供应休眠肿瘤保持小的状态,但是损害中的肿瘤细胞快速更新,其细胞分裂速度与编程性细胞死亡速度平衡。因此,甚至休眠肿瘤也是本发明技术的合适的靶物。在临床明显转移和微转移这两种情况下,编程性细胞死亡-抗性癌细胞能与易受影响的癌细胞混合。如果对通过第一次治疗使得编程性细胞死亡的附近癌细胞递送肿

瘤杀伤的非交叉抗性和/或协同方法,则能发生这些存活癌细胞补充杀伤。以旁观杀伤潜力帮助这项技术的另外的技术能改进它的治疗效果。

[0210] 因此,本发明最优的实施方案涉及转移癌的治疗。

[0211] 根据这个优选实施方案,提供对受试者治疗性治疗转移癌的方法,所述方法包括在足以抑制、减小或另外减量调节所述转移癌生长的时间和条件下,对所述受试者施用有效量的针对La或者其抗原部分的免疫活性分子,所述免疫活性分子与治疗性效应子结构连接、键合或另外缔合。

[0212] 如上文详细描述,本发明还应该理解延伸至体外环境下肿瘤细胞生长的减量调节。例如,可以从骨髓或外周血肝细胞的培养液清除肿瘤细胞,然后自身移植。

[0213] “有效量”意思是至少部分获得期望响应,或者推迟发生或抑制进程或者两者均停滞所治疗的特定病症的发生或发展所必需的量。这个量根据下面的因素而变化:待治疗的个体的健康和身体状况,待治疗的个体的分类组,期望的保护程度,组合物制剂,医学情形评价,和其他相关因素。预期这个量落在能通过常规试验确定的相对宽的范围之内。

[0214] 本发明进一步涉及联合治疗,例如在癌症治疗中施用本发明抗体的同时,使哺乳动物接受循环细胞毒性药物或放疗。

[0215] 通过任何方便的方法可以实施药物组合物形式的相互作用分子(这里称作“调节剂”)的给药。当以根据特定情况的量给药时,药物组合物的调节剂表现出治疗活性。变化取决于例如人或动物和调节剂的选择。可以使用宽范围剂量。考虑到患者,对于每千克体重每天可以施用例如大约0.1mg至大约1mg的调节剂。可以调节给药方案,提供最佳治疗反应。例如,可以连续、每天、每周、每月或者其他合适的时间间隔以几个分开的剂量给药,或者根据其情形的紧急状况按比例减小剂量。

[0216] 可以以适当方式施用调节剂,例如通过口服,静脉内(水溶性情况下),腹膜内,肌内,皮下,真皮内或栓剂途径或埋入(例如使用缓释分子)。可以以药学可接受无毒盐形式施用调节剂,例如酸加成盐或金属络合物,例如与锌、铁等的盐或金属络合物(其认为是为了本申请目的的盐)。这样的酸加成盐的例证是盐酸盐,氢溴酸盐,硫酸盐,磷酸盐,马来酸盐,乙酸盐,柠檬酸盐,苯甲酸盐,琥珀酸盐,苹果酸盐,抗坏血酸盐,酒石酸盐等等。如果要施用的活性成分是片剂形式,片剂可以含有粘合剂,例如黄蓍胶,玉米淀粉或明胶;崩解剂,例如藻酸;和润滑剂,例如硬脂酸镁。

[0217] 给药途径包括但不限于,呼吸,气管内,鼻咽,静脉内,腹膜内,皮下,颅内,真皮内,肌内,眼内,大脑内,鼻内,输入,口服,直肠给药,通过IV滴注、贴剂和植入物。

[0218] 根据这些方法,根据本发明限定的药物可以和一种或几种其他化合物或分子共同给药。所谓“共同给药”意思是在相同的制剂中或者以两个分开的制剂,通过相同或不同途径同时给药,或者通过相同或不同途径依次给药。例如,为了增强效果,本发明药物可以与激动剂一起给药。所谓“依次”给药意思是施用两种类型分子之间间隔数秒、数分钟、数小时或者数天时间间隔。这些分子可以以任何顺序给药。

[0219] 本发明另一方面涉及与效应子结构偶联的抗-胞核分子相互作用分子用于制备对受试者治疗病症的药物的用途,所述病症以细胞编程性细胞死亡为特征,其中所述效应子结构治疗所述病症。

[0220] 优选地,所述胞核分子是La。

[0221] 优选地,所述相互作用分子是免疫活性分子,更优选抗-La抗体,例如单克隆抗体。

[0222] 最优选地,所述胞核定位是胞外定位,如上面所定义的。

[0223] 在另一个优选实施方案中,所述病症是心肌或脑组织梗塞,自身免疫和其他炎症疾病,病毒疾病,例如AIDS,神经退化疾病,例如早老性痴呆或帕金森病,急性实体器官或骨髓移植排异,化疗或放疗引起的组织损伤('粘膜炎')或瘤,如肿瘤。

[0224] 本发明涉及的肿瘤和肿瘤细胞的例子包括但不限于中枢神经系统瘤,视网膜母细胞瘤,成神经细胞瘤和其他儿科瘤,头颈癌(例如鳞状细胞癌),乳房和前列腺癌,肺癌(小细胞肺癌和非小细胞肺癌),肾癌(例如肾细胞腺癌),食管胃癌,肝细胞癌,胰管胆汁瘤形成(例如腺癌胰腺内分泌瘤),结肠直肠癌,宫颈癌和肛门癌,子宫和其他生殖道癌,尿道癌(例如输尿管和膀胱癌),胚细胞肿瘤(例如睾丸胚细胞肿瘤或卵巢胚细胞肿瘤),卵巢癌(例如卵巢上皮癌),未知的原发癌,人免疫缺陷相关恶性肿瘤(例如Kaposi's肉瘤),淋巴瘤,白血病,恶性黑素瘤,肉瘤,内分泌瘤(例如甲状腺瘤),间皮瘤和其他胸膜肿瘤,神经内分泌肿瘤和癌样肿瘤。

[0225] 另一方面,本发明涉及含有上文定义的调节剂和一种或几种药学可接受载体和/或稀释剂的药物组合物。所述调节剂指活性成分。

[0226] 适合注射使用的药物形式包括用于无菌注射液或分散体的临时制剂的无菌水溶液(水溶性情况下)或分散体和无菌粉末剂,或者可以是乳膏形式或者适局部施用的任何形式。它在制备和储存条件下必须是稳定的并且必须保留抗微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有,例如水,乙醇,多元醇(例如甘油,丙二醇和液体聚乙二醇等),其合适的混合物,以及植物油。通过使用包衣例如卵磷脂,在分散体情况下通过保持所需要的粒度以及通过使用表面活性剂可保持合适的流动性。通过各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯,氯丁醇,苯酚、山梨酸、硫柳汞等可防止微生物作用。在很多情况下,优选包括等张剂,例如,糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶可实现可注射组合物的延长吸收。

[0227] 根据需要,通过向合适溶剂中加入必需量的活性化合物和上面例举的各种其他成分,接着灭菌过滤来制备无菌可注射液。一般情况下,通过向含有基本分散介质和上面例举的那些必需的其他成分的无菌赋形剂中加入各种无菌活性成分来制备分散体。在用于制备无菌注射液的无菌粉末剂情况下,优选的制备方法是真空干燥和冻干技术,得到活性成分加来自其事先无菌过滤的溶液的另外期望的成分的粉末剂。

[0228] 当活性成分被适当保护时,它们可以例如用惰性稀释剂或用可同化食用载体口服给药,或者密封在硬或软壳体明胶胶囊,或者可以压制成片,或者可以直接与食品混合。对于口服治疗性给药,活性化合物可以与赋形剂混合并且以可吸收片剂、口腔片剂、锭剂、胶囊、酏剂、混悬剂、糖浆、纸囊剂等形式使用。这样的组合物和制剂应该含有至少1%重量的活性化合物。当然,组合物和制剂的百分比可以变化,并且适宜地在大约5%至大约80%重量单位之间。这样的治疗用组合物中活性化合物的量为获得合适的剂量。制备根据本发明优选的组合物或制剂,使得口服剂量单位形式含有大约0.1微克至2000mg之间的活性化合物。

[0229] 片剂、锭剂、胶囊等还可以含有下面列出的成分:可以加入粘合剂,例如树胶,阿拉伯胶,玉米淀粉或明胶;赋形剂,例如磷酸二钙;崩解剂,例如玉米淀粉,马铃薯淀粉,藻酸等等;润滑剂,例如硬脂酸镁;和甜味剂,例如蔗糖,乳糖或糖精,或者矫味剂,例如薄荷,冬绿

树油,或樱桃调味料。当剂量单位形式是胶囊,其除了上面类型材料之外可以含有液体载体。可以存在各种其他材料,如包衣或者另外改变剂量单位的物理形式。例如,片剂,丸剂或胶囊可以用虫胶糖或者两者来包衣。糖浆或酞剂可以含有活性化合物,作为甜味剂的蔗糖,作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和羟苯甲酸丙酯,染料和矫味剂,例如樱桃或橙子调味料。当然,在制备单位剂量形式中使用的任何材料应该是药学的并且在使用量时基本上是无毒的。另外,活性化合物可以加入到缓释制品和制剂中。

[0230] 还有,本发明的另一方面涉及上文定义的当在本发明方法中使用的药物。

[0231] 通过下面非限制性实施例进一步说明本发明。

[0232] 实施例1

[0233] 这里使用的抗-La抗体是小鼠单克隆抗体杂交瘤3B9,它识别小核糖核蛋白抗原La/SS-B的人和小鼠形式。抗体来源于Tom Gordon教授,Flinders Medical Centre, Adelaide, South Australia,他是从Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, Oklahoma, USA的M. Bachmann博士那里获得的。Dr. Gordon的工作组公开了3B9(Tran等2002a)。相应的同种型对照抗体杂交瘤是Sa15。

[0234] 对六只野生型(ST)C57BL/6雄性小鼠(七周龄)或两只六月龄小鼠前列腺转基因腺癌(TRAMP)小鼠(第1栏)每天两次给予400微升正常人血清(NHS)或含有La-反应自身抗体的人血清(La血清)静脉内注射。在第一次注射这一天保持小鼠完整或者手术阉割(第2栏)。第二次注射两天之后将小鼠杀死用于分析。对注射了La血清的所有小鼠通过ELISA测定与小鼠La交叉反应的hIgG的高水平。用NHS的负对照显示和没有注射正常小鼠血清(NMS)一样的低的结合背景水平(第3栏)。ELISA中使用鸡蛋溶菌酶(HEL)作为阴性对照(第4栏)。通过定量ELISA直接测定hIgG的血清水平,并且发现比以前叙述的实验高得多(Tran等,2002b)。对怀孕BALB/c小鼠注射La血清并且血清hIgG范围是0.01至0.4g/L,其产生好的胎儿编程性细胞死亡心肌细胞的调理作用(第5栏)。通过TUNEL测定法测定前列腺上皮编程性细胞死亡程度。表中指示的数字代表在整个切片上可获得的前列腺上皮层中检测的TUNEL⁺核。对几乎所有动物的前列腺腔中检测到的众多TUNEL⁺粒子不计数。与完整小鼠相比,阉割小鼠有增加编程性细胞死亡的倾向(第6栏)。对阉割并且给与La血清注射的三只小鼠中的一只检测hIgG与编程性细胞死亡前列腺上皮细胞的结合(第7栏)。在这种情况下,在前列腺腔检测到明亮颗粒hIgG包被的众多TUNEL⁺细胞。在上皮及其表面也见到hIgG与TUNEL⁺细胞的结合。连续(毗连)切片的免疫标记提示这些免疫复合体的附近存在MHC-II⁺和F4/80⁺细胞(没有给出数据)。明显地,对注射NHS的动物或者注射La血清但是没有阉割的动物没有检测到hIgG的结合。作为另外的对照,对用La血清或NHS注射的所有动物测定充足背景空隙和血管内hIgG(前列腺,脾,肝,唾液腺),保持hIgG可检测血清水平。正如所预期的,测定脾和胸腺中众多的编程性细胞死亡细胞,特别地,脾显示明显的hIgG散斑染色(血液组织屏障在这种组织中低)没有相关的TUNEL染色。阉割之后在唾液腺中几乎检测不到编程性细胞死亡细胞,与腺上皮中阉割导致的编程性细胞死亡是前列腺特异性的想法相吻合。

[0235] 表3. 实验结果的制表和叙述性概述

[0236]

动物	治疗	与重组抗原结合的血清 hIgG (ELISA OD ₄₉₂)		hIgG 的血清水平 (g/L)	每个切片中前列腺上皮层中 TUNEL (+) 核	与编程性细胞死亡细胞结合的 hIgG
		6HisLa	6HisHEL			
WT	完整, La 血清	1.850	0	3.2	2, 3	-
WT	完整, La 血清	1.684	0	2.5	1	-
WT	阉割的, La 血清	1.534	0	1.8	>30	+
WT	阉割的, La 血清	1.685	0	2.7	8, 10	-
WT	完整, NHS	0.007	0	1.5	N/A	-
WT	阉割, NHS	0.014	0	0.9	1, 3, 10	-
TRAMP	阉割的, La 血清	1.588	0	2.4	>30	-
TRAMP	完整, La 血清	1.389	0	1.6	5	-
NMS	N/A	0.016	0	N/A	N/A	N/A

[0237] 实施例2

[0238] 抗-La抗体结合编程性细胞死亡和坏死细胞

[0239] 体外诱导编程性细胞死亡并发展,编程性细胞死亡细胞逐渐变得遗漏,因为丧失了膜的完整性,其表现出渐增的分别对于核酸和DNA结合染料,碘化丙锭(PI)和7-氨基-放线菌素D(7AAD)的亲合力。与PI结合相比,抗La-抗体与编程性细胞死亡的结合具有更慢的时间。然而,观察到的抗La-抗体染色的荧光强度表明,它以类似的亲和性与编程性细胞死亡细胞结合,而不管PI染色是否是高或中等强度(图3)。如下所示,PI^{中间值}亚群包括编程性细胞死亡体。中间染色不是中止人为现象的结果,因为无论PI浓度的改变它均存在。

[0240] 因此,抗-La抗体与编程性细胞死亡细胞结合是作为体外编程性细胞死亡进程的膜完整性损失的函数。然而,抗-La抗体与编程性细胞死亡细胞结合不是简单的mAb的被动结合事件,因为用同种型对照mAb Sa15染色的荧光强度比3B9(抗-单克隆抗体)荧光强度低一个log-fold,这表明3B9与它的靶抗原人La/SS-B特异性结合(画面上组和中组,图4)。识别细胞支架成分的抗-微管蛋白mAb也证明与编程性细胞死亡细胞结合的高水平,它比3B9结合较少的PI^{中间值}编程性细胞死亡体(画面下组,图2)(总PI⁺事件的46%,参考69%)。

[0241] 图示说明图4中所示的一些数据,并且在各个时间点比较没有台盼蓝的细胞的百分比,其是细胞存活力丧失的另一个指征(图5)。毫无疑问,抗-La抗体与编程性细胞死亡细胞结合的动力学与细胞渗透性(微管蛋白)的已知标记物和细胞存活力丧失(台盼蓝)相比较,这支持与编程性细胞死亡相关的膜完整性丧失允许抗-La抗体结合的想法。

[0242] 如图6阐明的,来自编程性细胞死亡Jurkat细胞的编程性细胞死亡体大小是稳定的(画面下组,图6),几乎持续四天的时间,可与3B9染色强度(画面上组,图6)相比。

[0243] 使用膜联蛋白V探测外质膜上暴露的磷脂酰丝氨酸进行抗-La抗体与编程性细胞死亡Jurkat细胞结合的进一步动力学分析,外质膜上暴露的磷脂酰丝氨酸是编程性细胞死亡的早期特征,并且7AAD结合遗漏细胞的DNA,它是晚期编程性细胞死亡特征。这个分析再次表明抗-La抗体结合是与7AAD结合等同的,但是比膜联蛋白V结合晚发生(图7)。这个概念

在图8中以另一种方式展示。当细胞是膜联蛋白V-阳性而7AAD-阴性时,抗-La抗体结合在早期编程性细胞死亡期间不明显(画面左手组中R3,图8),但是一旦细胞变得对于7AAD可渗透,则抗-La抗体结合增加至高水平(画面左手组中R1,图8)。

[0244] 为了强调抗-La抗体结合必需细胞膜完整性丧失,初级坏死细胞也证实对于抗-La抗体的急切的结合(图9)。注意抗-La抗体染色与暴露在坏死细胞膜(图9B)上的DNA或磷脂酰丝氨酸不共同定位(图9A)。

[0245] 实施例3

[0246] 抗-La抗体与编程性细胞死亡体的结合是半胱天冬酶3依赖性的

[0247] 如实施例2提到的,更详细的流式细胞仪分析指示抗-La抗体结合编程性细胞死亡体,其特征在于它们较小的大小和减小的内部复杂性,因为它们含有不同比例的膜结合的胞核成分和细胞器残留物(图10)。此外,证明编程性细胞死亡体形成对于抗-La抗体结合是必需的。MCF-7是没有原半胱天冬酶3基因的人乳房癌细胞系。

[0248] 原半胱天冬酶3是决定性的executioner半胱天冬酶3的酶原形式,它催化死亡细胞中很多功能和结构蛋白质的裂解。这些蛋白质的半胱天冬酶3-介导的裂解对编程性细胞死亡体形成的形态外观有贡献,它将编程性细胞死亡细胞分裂为几种(或更多)已知是编程性细胞死亡体的较小的膜结合部分。虽然MCF-7细胞不能证明细胞死亡期间编程性细胞死亡体形成,通过将原半胱天冬酶3的基因转染到MCF-7细胞中能挽救这种表型。

[0249] 如图10说明的,用原半胱天冬酶3的基因瞬时转染MCF-7细胞,产生编程性细胞死亡体并且接着结合抗-La抗体。因此,抗-La抗体与编程性细胞死亡体结合是半胱天冬酶3依赖性的。这些编程性细胞死亡体不用7AAD染色,其优先染色DNA而不是RNA(画面左下手组,图10)。此外,当通过散射标准评价时,编程性细胞死亡体大小更小(画面右下手组,图10)。

[0250] 进一步,研究用原半胱天冬酶3的基因稳定转染的MCF-7。如图11所示,使包含对照载体或原半胱天冬酶3基因的MCF-7细胞编程性细胞死亡,并且用已经用绿色荧光染料标记的3B9、Alexa488和碘化丙锭染色(图11A)。再一次证明抗-La抗体与编程性细胞死亡体结合需要半胱天冬酶3活性。这些细胞的荧光显微镜证明表达MCF-7转染子的原半胱天冬酶3萌芽并且明显分隔3B9⁺编程性细胞死亡体(图11C)。另一方面,载体对照MCF-7细胞证明3B9染色较少分散模式(图11C),这与对载体对照MCF-7细胞的流式细胞仪观察到的3B9染色广泛分布相吻合(画面右上手组,图11A)。相反,如在图10中,半胱天冬酶3活性带来3B9染色的受限模式(画面右下手组,图11A),这提示半胱天冬酶3活性导致编程性细胞死亡体中La/SS-B抗原的均匀分隔。

[0251] 如图12所示,利用编程性细胞死亡Jurkat细胞的同焦点激光扫描显微镜证明抗-La抗体染色既不与转化磷脂酰丝氨酸的编程性细胞死亡细胞膜染色重叠(根据膜联蛋白V检测的),也不对DNA染色(根据TOPO3检测的)(图13A)。此外,一连串垂直切片证实贯穿死亡细胞的胞质区发生抗-La抗体染色。用3B9染色是特异性的,因为使用同种型对照物mAb, Sa15,几乎没有发现任何染色(图13B)。PARP,其是丰富的胞核抗原(包括大约2%的胞核蛋白质)并且在编程性细胞死亡期间半胱天冬酶3还将其裂解,当用特异性mAb检测时,采用类似于3B9的染色模式(图12C)。这些数据一起提示抗-La抗体'加载'死亡细胞的胞质(图13)。

[0252] 对胞核抗原例如胞衬蛋白特异性的其他mAb,其也被半胱天冬酶3裂解,因此对编程性细胞死亡体形成有贡献,用与3B9展示的类似的染色模式对编程性细胞死亡Jurkat细

胞染色(图14)。对于对PCNA和核纤层蛋白B特异性的mAb也观察到类似的染色模式。这些mAb证明根据7AAD检测的不与DNA共同定位。事实上,7AAD倾向于限于外周编程性细胞死亡胞。相反,用抗- β 微管蛋白mAb染色是一定程度上与7AAD染色一起定位的贯穿编程性细胞死亡细胞的证据。

[0253] 抗-La抗体还结合编程性细胞死亡初级T细胞,包括大多数外周血单核细胞(PMBC)。然而,与初级T细胞结合的抗-La抗体的荧光强度比对恶性Jurkat T细胞观察到的小大约一半对数倍(one half-log fold),甚至事先用T细胞促细胞分裂剂,concanavalin A激活PBMC(图15)。

[0254] 实施例4

[0255] 抗其他胞核和核糖核抗原的其他单克隆抗体也结合编程性细胞死亡细胞

[0256] 根据在同焦点激光扫描显微镜研究中观察到的,流式细胞计证明多种mAb结合相似的动力学和模式。抗-微管蛋白mAb作为可渗透编程性细胞死亡细胞中胞质结合的对照物(图16)。类似地,这些mAb中的一些特异性结合用原半胱天冬酶3基因转染MCF-7细胞之后形成的编程性细胞死亡体(图17)。

[0257] 实施例5

[0258] 抗人LA/SS-B的其他抗体也检测编程性细胞死亡细胞

[0259] 研究了人抗-La自身抗体(图18)和对人La/SS-B具有特异性的另一种mAb,克隆SW3对编程性细胞死亡细胞的结合(图19)。

[0260] 实施例6

[0261] 抗-LA抗体结合来自人和啮齿动物物种的初级和恶性编程性细胞死亡细胞

[0262] 除了结合编程性细胞死亡初级人细胞之外(图15),抗-La抗体还结合其中用地塞米松或staurosporine体外诱导编程性细胞死亡死亡小鼠和大鼠胸腺的编程性细胞死亡初级细胞。抗-La抗体响应任一种刺激物诱导的编程性细胞死亡而特异性结合PI⁺胸腺细胞(图20)。使用抗增殖细胞胞核抗原(PCNA)的mAb观察到相似结合模式。抗-La抗体还结合来自啮齿动物物种的编程性细胞死亡肿瘤细胞(图21),包括响应细胞毒性药物体内经历编程性细胞死亡的肿瘤细胞,以及多种编程性细胞死亡人和猴子肿瘤细胞系(图22)。

[0263] 本领域技术人员明白这里描述的本发明除了具体描述的之外还容易进行改变和修饰。理解本发明包括所有这样的改变和修饰。本发明还包括该说明书单个地或概括地指出或指明的所有步骤和特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征的两个或几个的任何和所有的组合。参考文献:

[0264] Adams等,Cancer Res.53:4026-4034,1993。

[0265] Bachmann等,Proc Natl Acad Sci USA83(20):7770-7774,1986。

[0266] Blankenberg等,Clin Cancer Res2002。

[0267] Brinkley等,美国专利No.5,326,692。

[0268] Callahan等,Cell Death Different7(7):645-653,2000。

[0269] Carmo-Fonseca等,ExpCell Res185(1):73-85,1989。

[0270] Chothia等,J.Mol.Biol.196:901,1987。

[0271] Chothia等,J.Mol.Biol.227:799,1992。

[0272] Chou等(美国专利No.6,056,957)。

- [0273] Coligan等,Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,Inc.,1991-1997。
- [0274] Cumber等,J Immunol149:120-126,1992。
- [0275] Davies&Riechmann,FEBS Lett.339:285-290,1994。
- [0276] Gefter等,Somatic Cell Genet.3.231-236,1977。
- [0277] Glockshuber等,Biochem.29:1363-1367,1990。
- [0278] H.Lecoeur等,J Immunol Methods2002。
- [0279] Hamel等Cytometry25(2):173-181,1996。
- [0280] Hamers-Casterman等,Nature363:446-448,1993。
- [0281] Jones等,Nature321.522-525,1986。
- [0282] Kabat等,"Sequences of Proteins of Immunological Interest",U.S.Department of Health and Human Services,1983。
- [0283] Kennet等(编著),Monoclonal Antibodies and Hybridomas:A New Dimension in Biological Analyses,pp.376-384,Plenum Press,New York,1980。
- [0284] Kohler和Milstein,Eur.J.Immunol.6(7):511-519,1976。
- [0285] Kohler和Milstein,Nature256:495-499,1975。
- [0286] Kostelny等,J.Immunol.148:1547-1553,1992。
- [0287] Kozbor等,Methods in Enzymology121:140,1986。
- [0288] Krahling等Cell Death Different6(2):183-189,1999。
- [0289] Krebber等,J.Immunol.Methods201(1):35-55,1997。
- [0290] Ku&Schutz,Proc.Natl.Acad.Sci.USA92:6552-6556,1995。
- [0291] Liu等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA84:3439-3443,1987。
- [0292] Mamula等,J Immunol143(9):2923-2928,1989。
- [0293] Morgan等(美国专利No.6,180,377)。
- [0294] Morikawa等,Cancer Immunol Immunother27(1):1-6,1988。
- [0295] P.Smolewski等,J Immunol Methods2002。
- [0296] Plunkthun等,In Antibody engineering:A practical approach 203-252,1996。
- [0297] Plunkthun,Biochem.31:1579-1584,1992。
- [0298] Pruijn等,Eur J Biochem232(2):611-619,1995。
- [0299] Queen等(美国专利No.6,180,370)。
- [0300] Ravirajan等,Lupus1(3):157-165,1992。
- [0301] Reiter等,Biochem.33:5451-5459,1994。
- [0302] Reiter等,Cancer Res.54:2714-2718,1994。
- [0303] Reiter等,J.Biol.Chem.269:18327-18331,1994。
- [0304] Richmann等,Nature332:323-327,1988。
- [0305] Shinohara等,J Immunother23(3):321-331,2000。
- [0306] Shulman等,Nature276:269-270,1978。
- [0307] Singer等,美国专利No.5,573,909。

- [0308] Toyama等, "Monoclonal Antibody, Experiment Manual", Kodansha Scientific, 1987出版。
- [0309] Tran等, Arthritis Rheum 46(1):202-208, 2002。
- [0310] Troster等, J Autoimmunity 8(6):825-842, 1995。
- [0311] Trowbridge, J. Exp. Med. 148(1):313-323, 1978。
- [0312] Verhoeyen等, Science 239:1534-1536, 1988。
- [0313] Volk等, J. Virol. 42(1):220-227, 1982。
- [0314] Ward等, Nature 341:544-546, 1989。
- [0315] Webber等, Mol. Immunol. 32:249-258, 1995。
- [0316] Winter和Milstein, Nature 349:293, 1991。
- [0317] Wu等, Nature Biotechnol 2002。

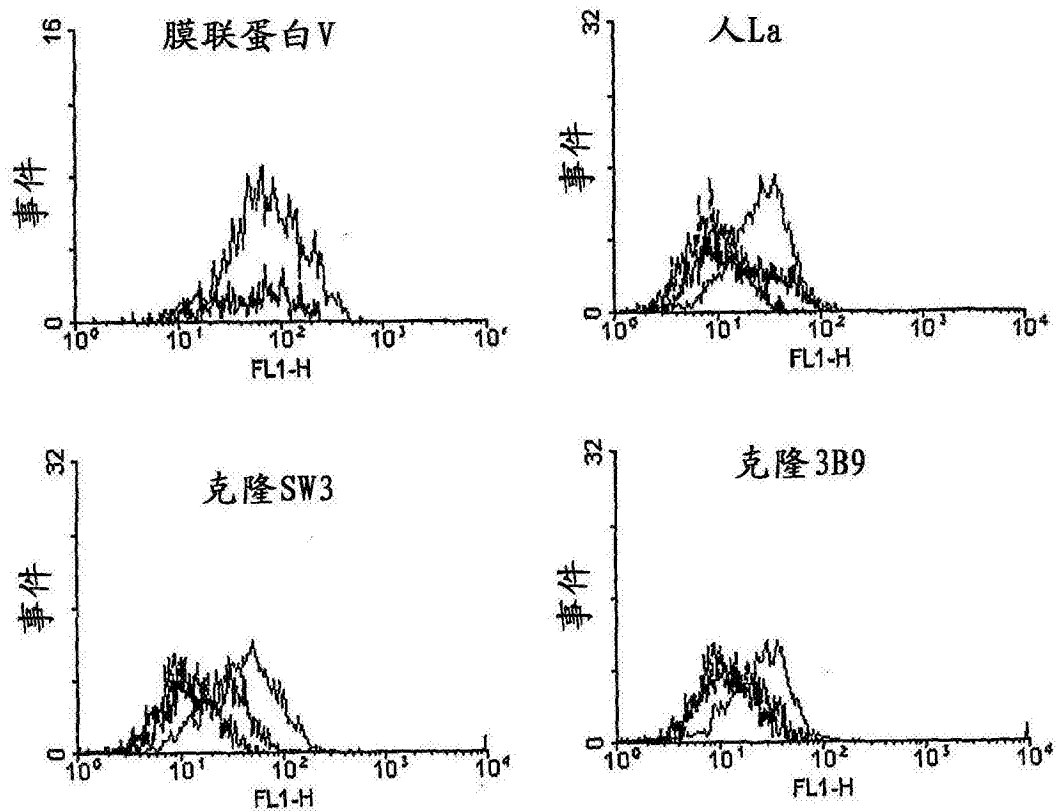


图1



图2A

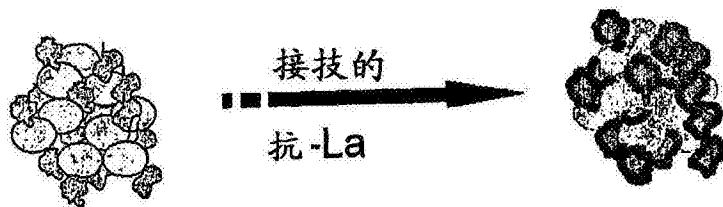


图2B

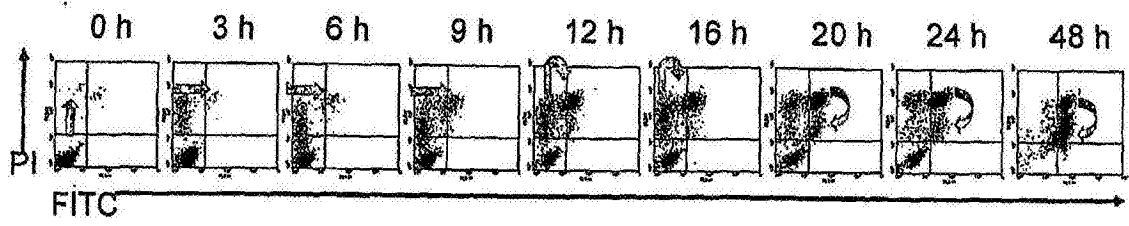


图3

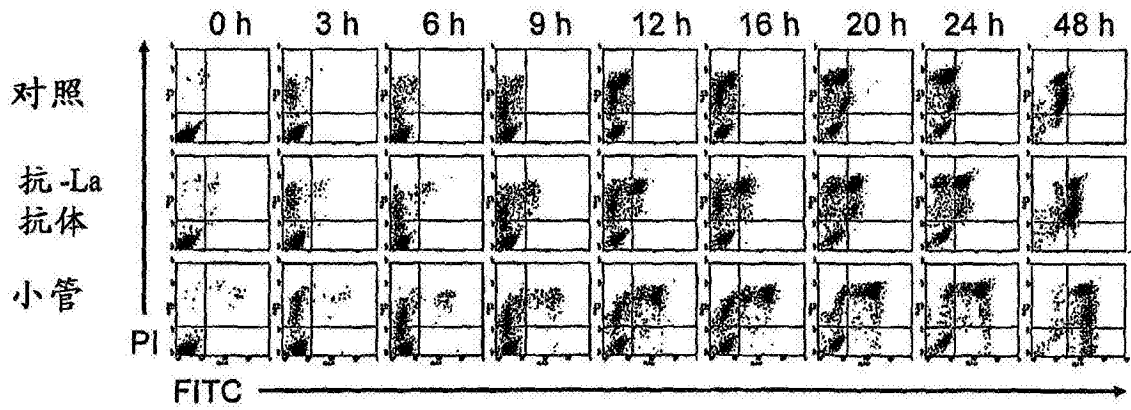


图4

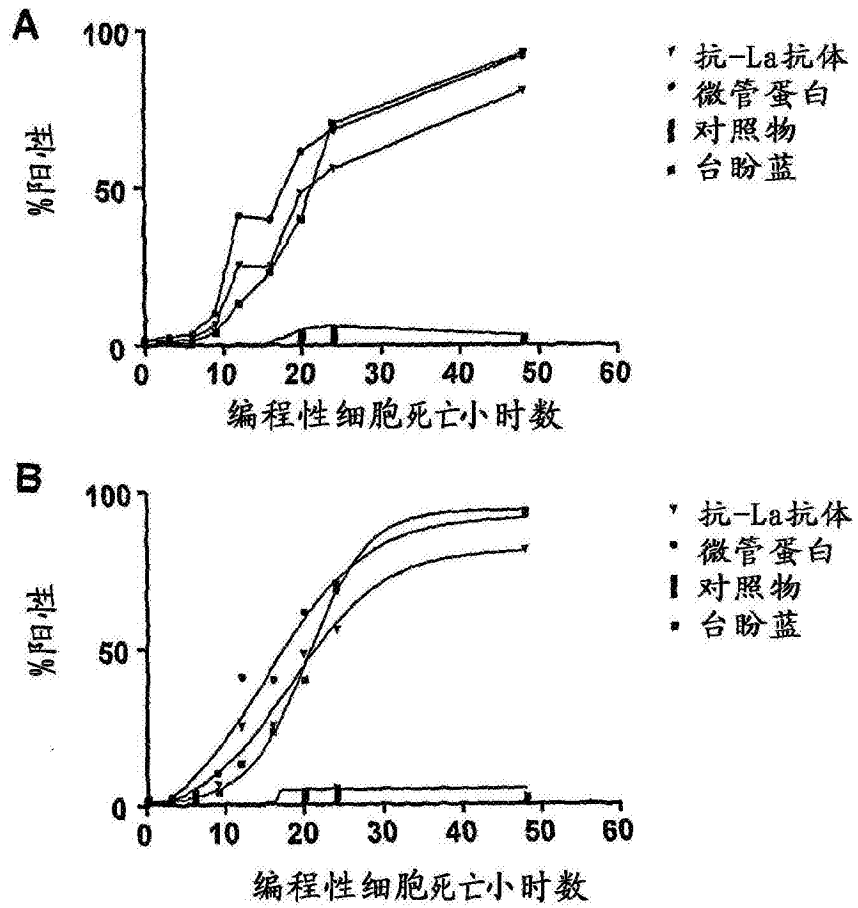


图5

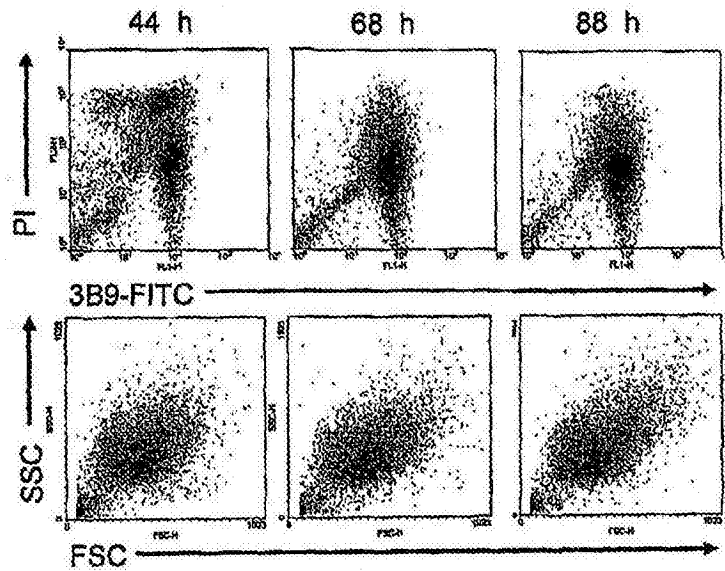


图6

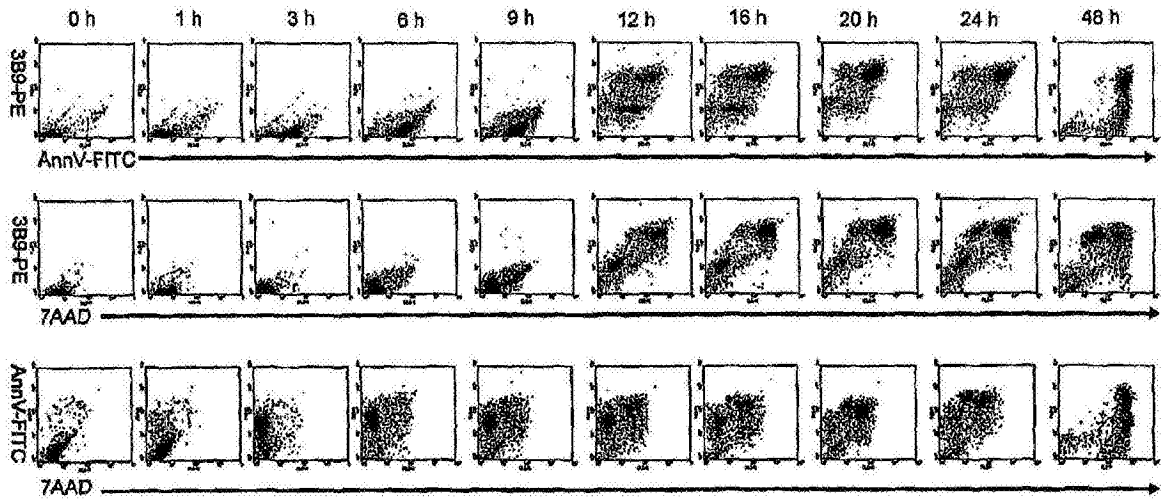


图7

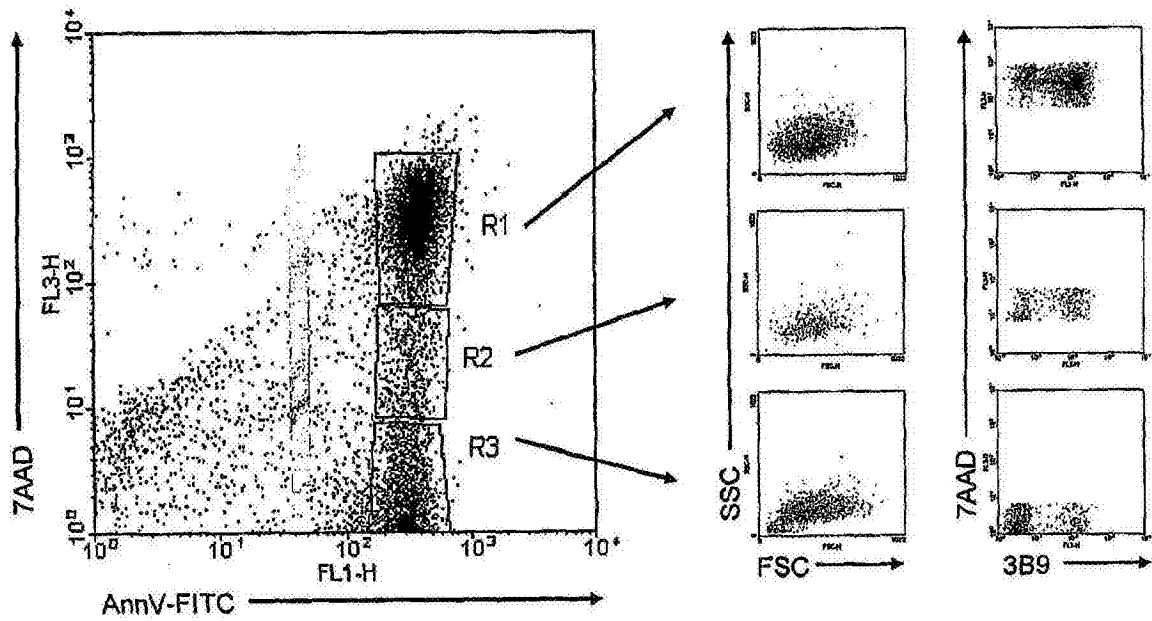


图8

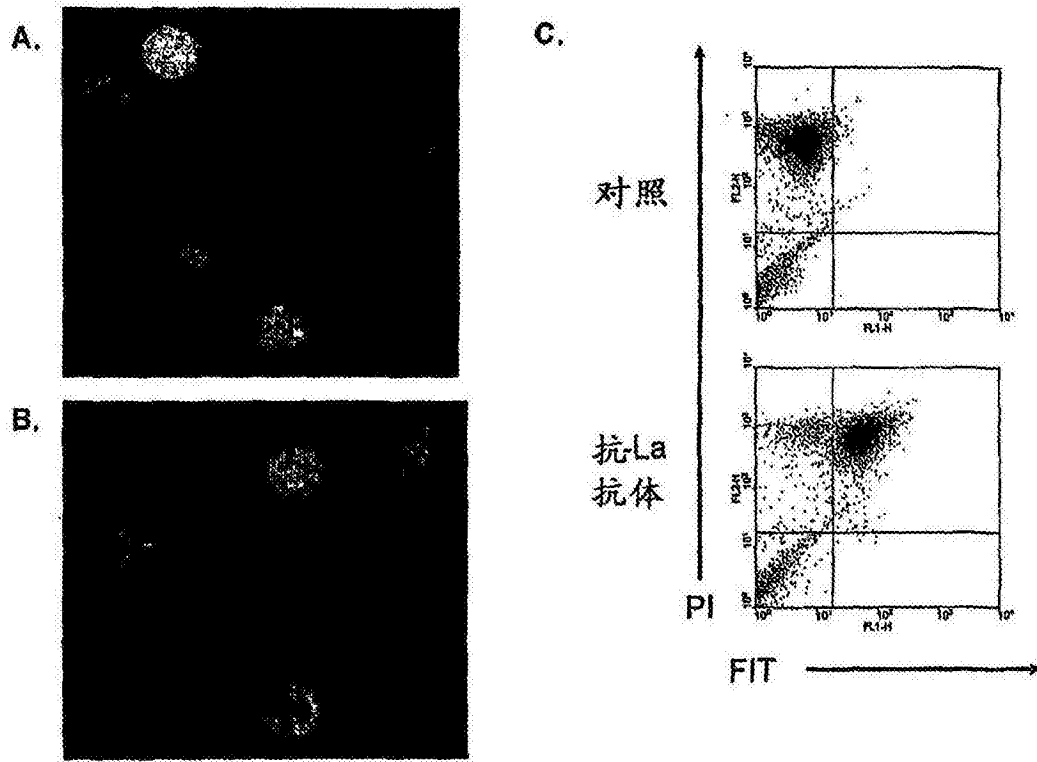


图9

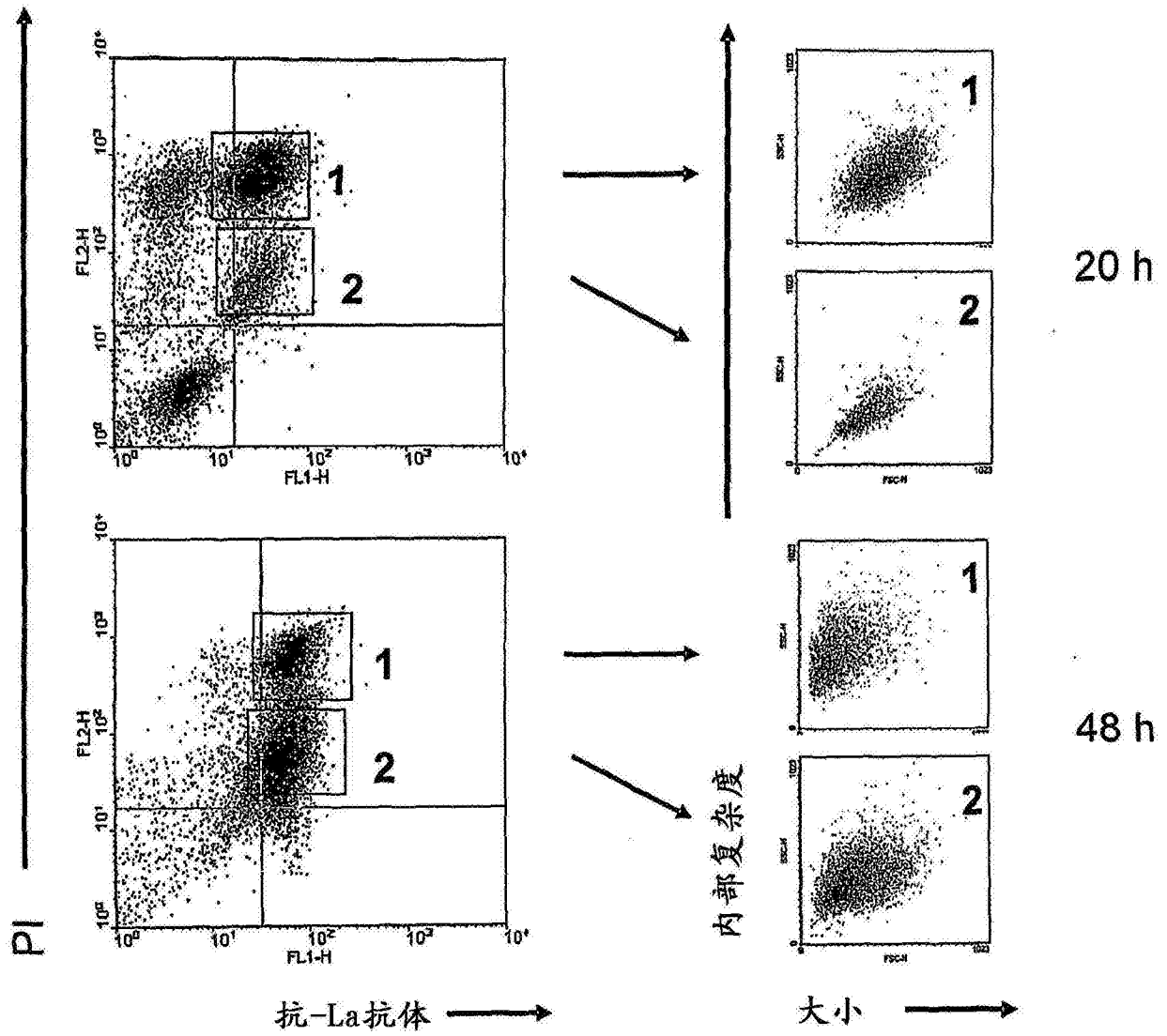


图10

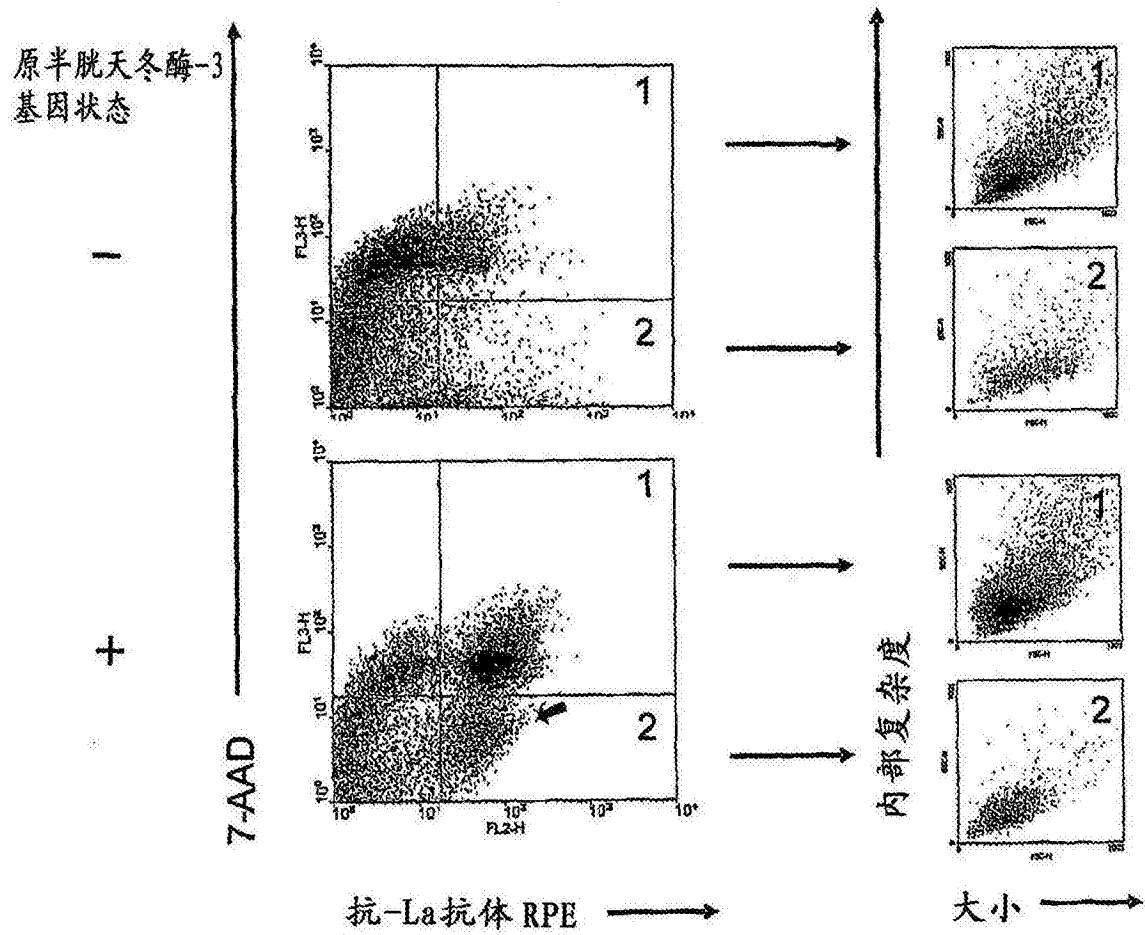


图11

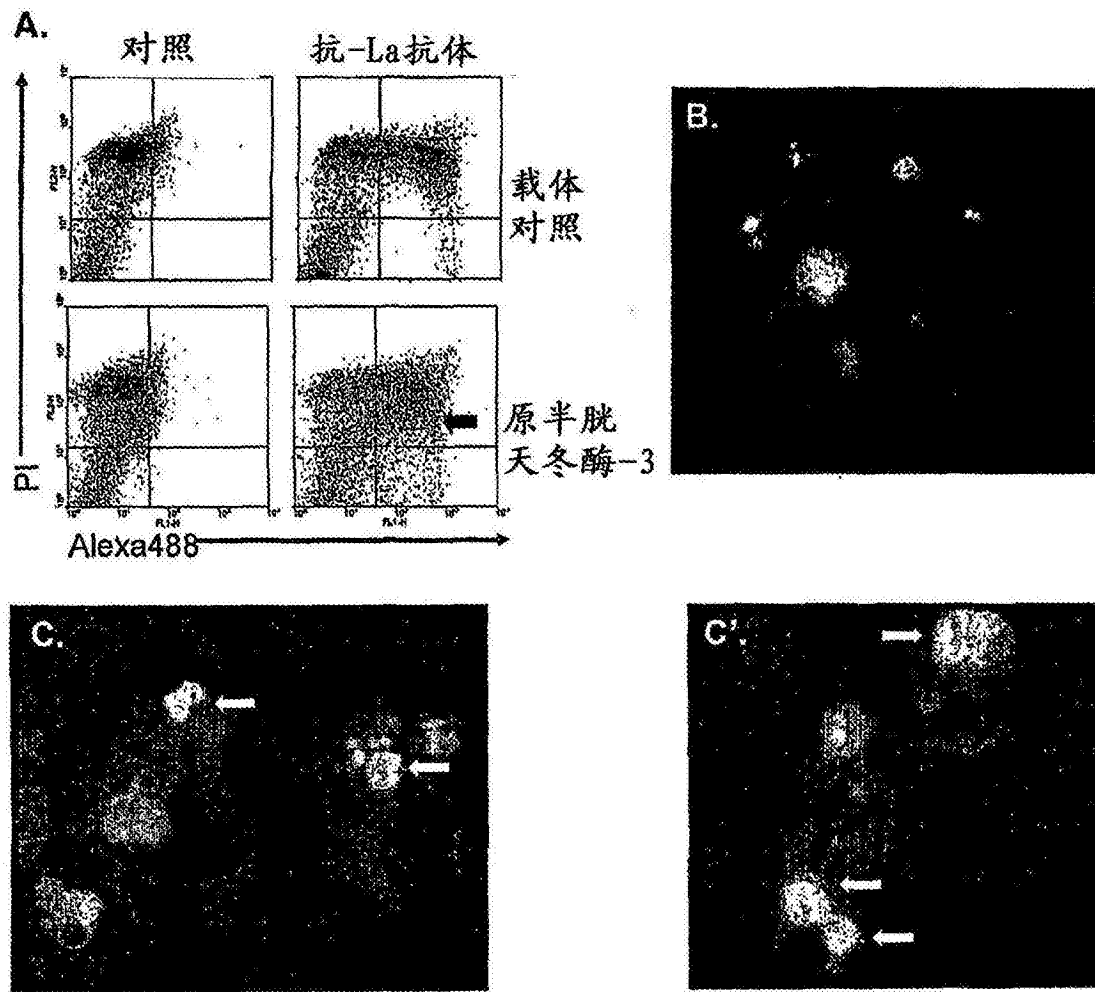


图12

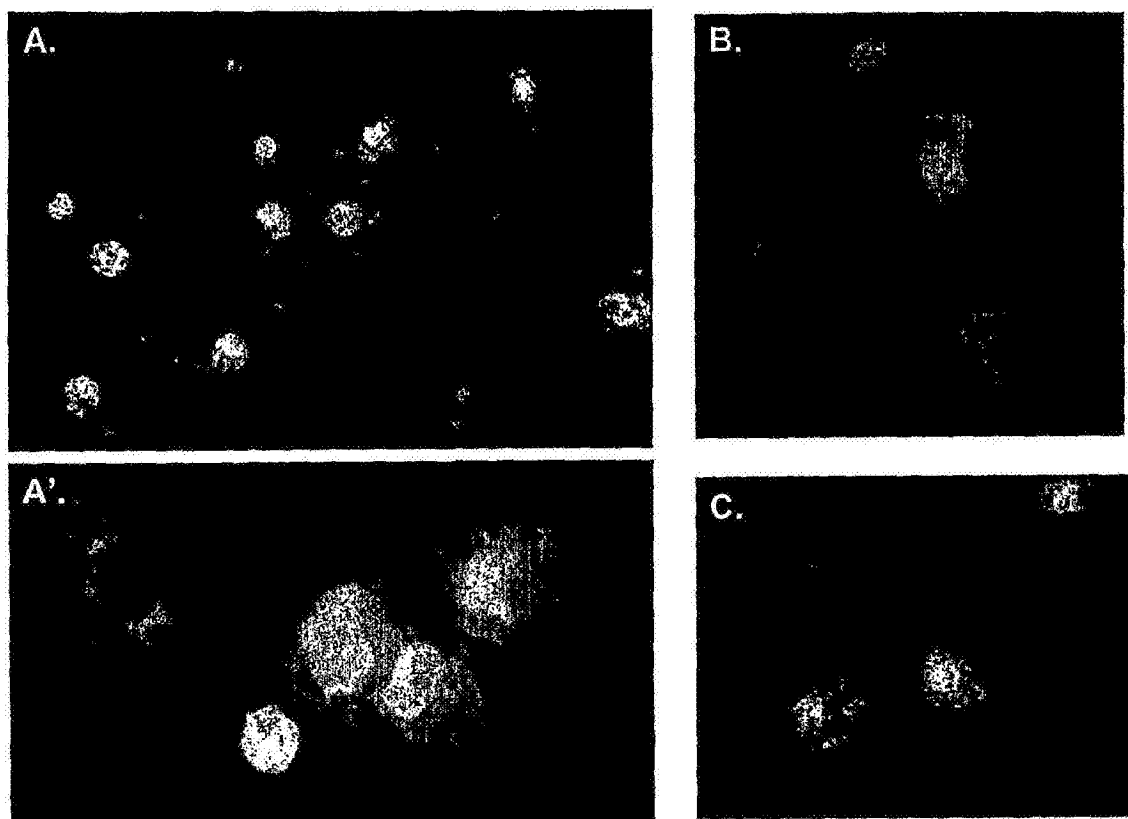


图13

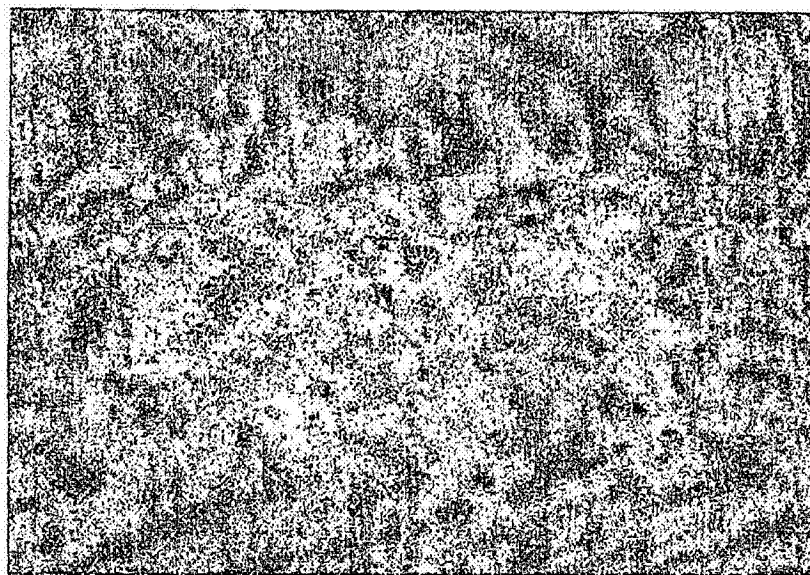


图14

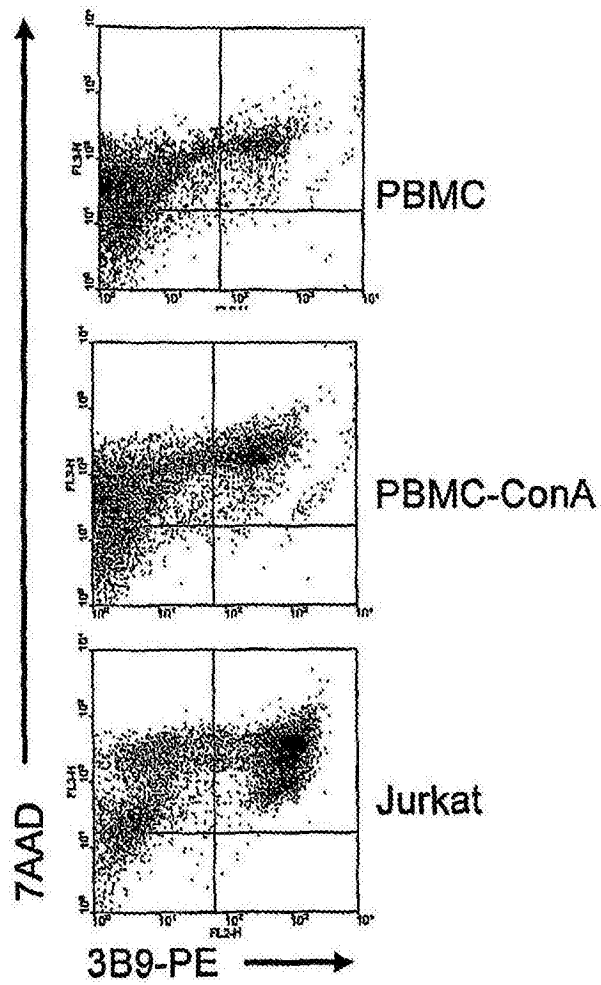


图15

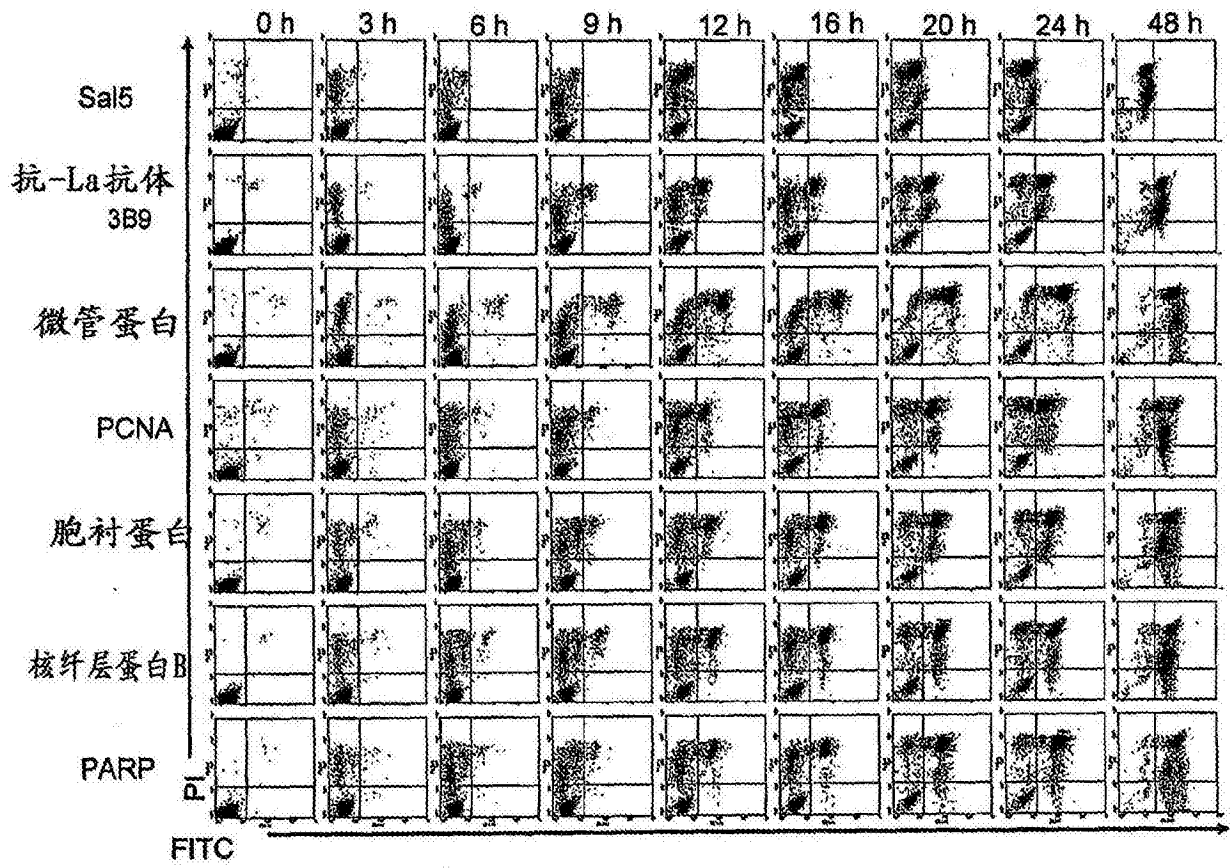


图16

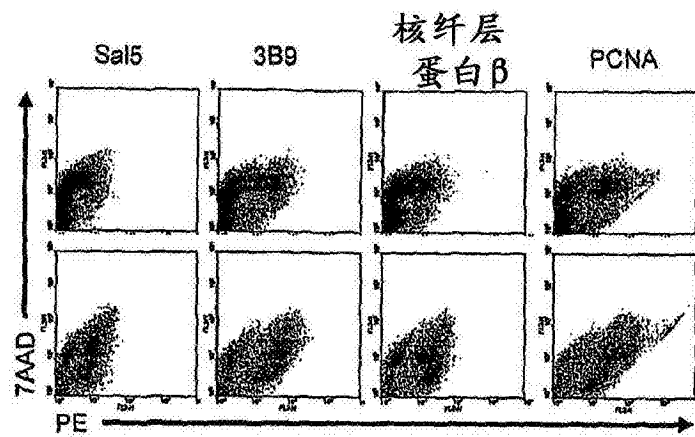


图17

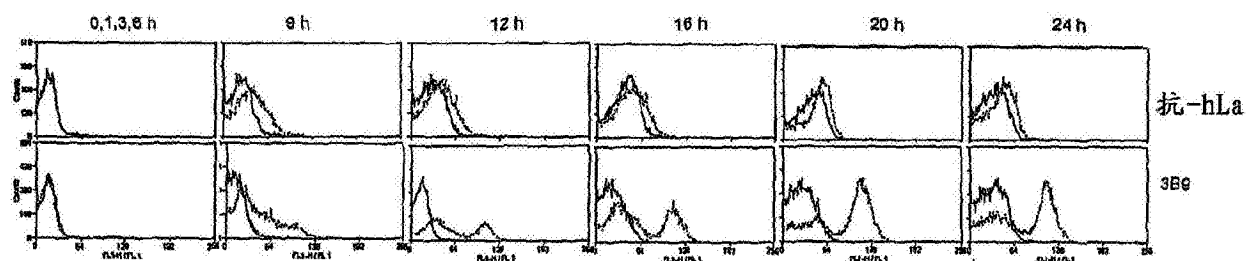


图18

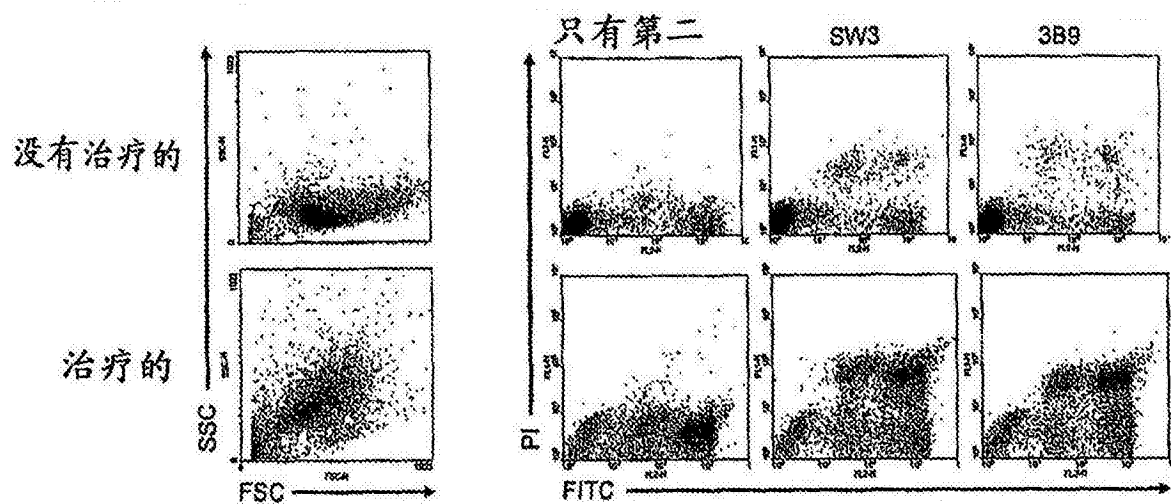


图19

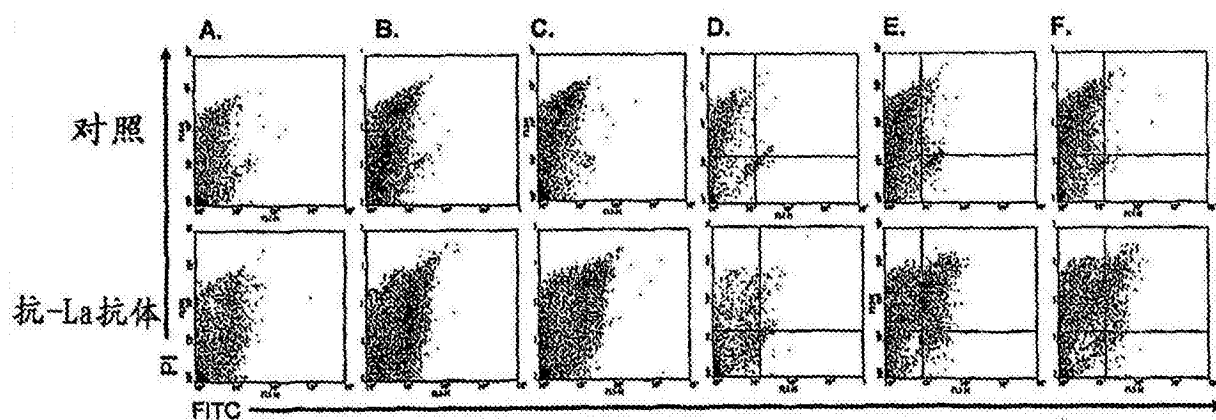


图20

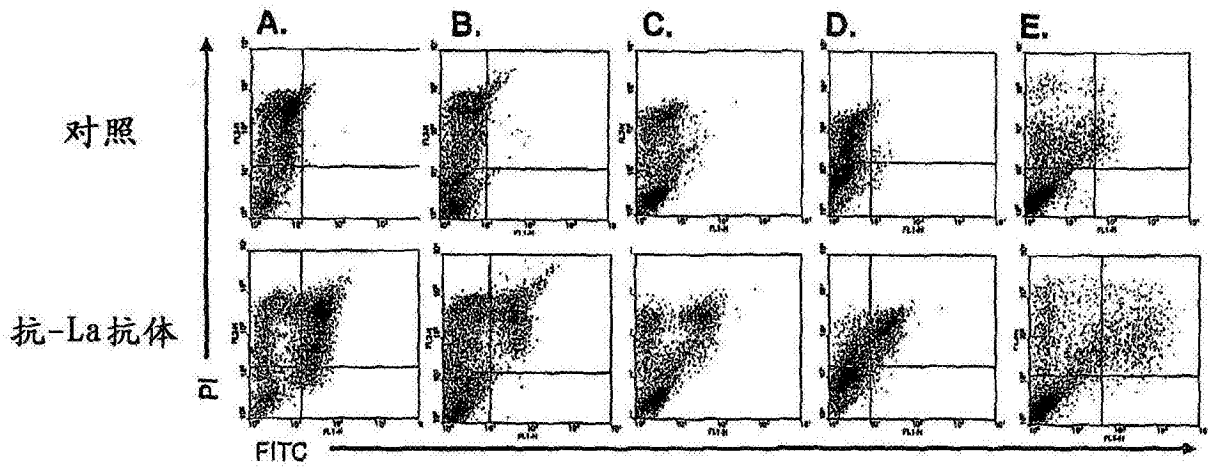


图21

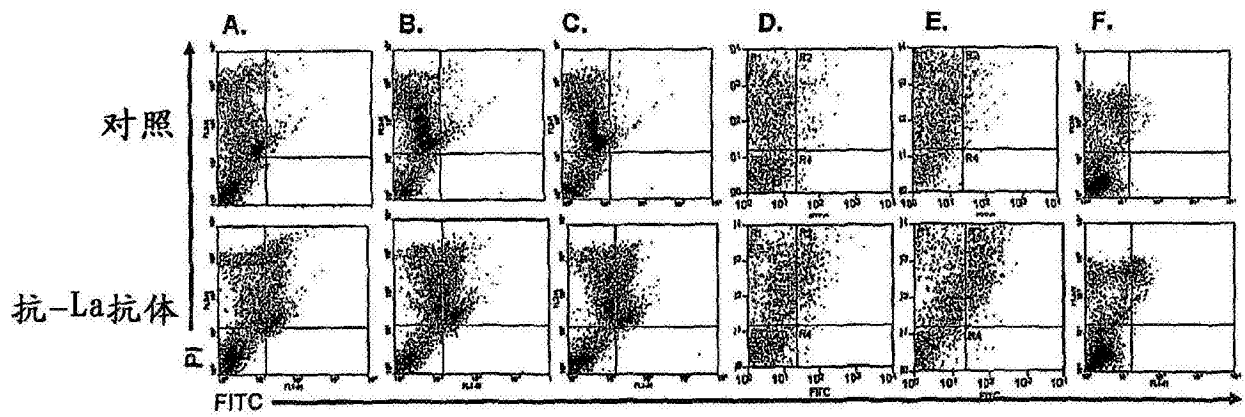


图22

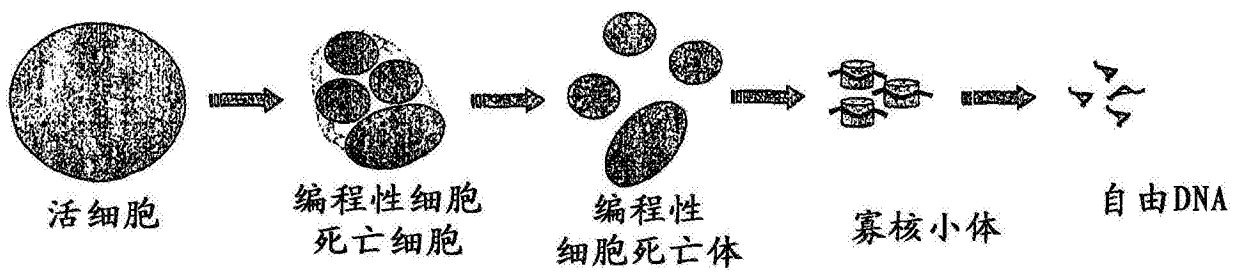


图23

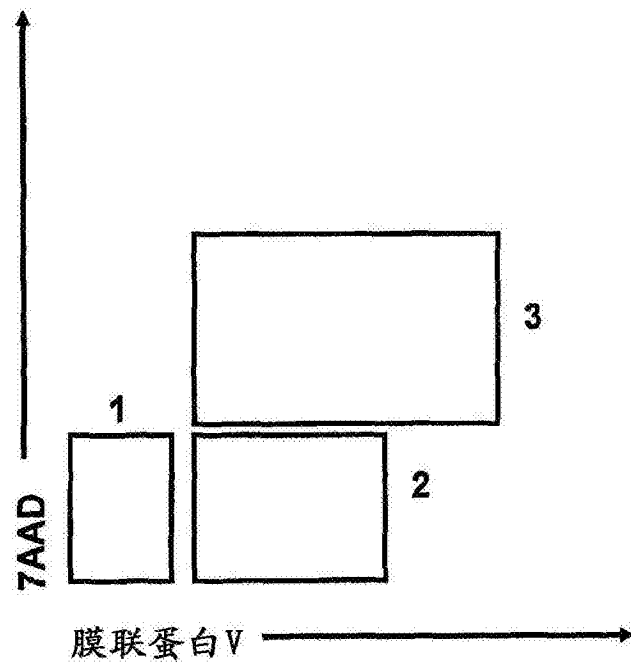


图24